

Funktionelle Charakterisierung von Neuropilin-1 in CD4⁺ T-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Marina Hutzler
aus Dortmund

September 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Wiebke Hansen

2. Gutachter: PD Dr. Stefanie Flohé

Vorsitzender für den Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Das Immunsystem.....	7
1.1.1 Die angeborene Immunität	7
1.1.2 Die adaptive Immunität.....	8
1.2 T-Lymphozyten.....	9
1.2.1 CD4 ⁺ T-Zellen (T _H)	10
1.2.2 CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL, <i>engl. cytotoxic T lymphocyte</i>)	11
1.2.3 Regulatorische T-Zellen (Treg).....	12
1.2.4 Suppressionsmechanismen von Tregs.....	17
1.3 Neuropilin-1	20
1.4 Regulatorische T-Zellen in der Tumorentstehung	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Mauslinien	27
2.1.1 CD4-Nrp1 x Thy 1.1.....	27
2.1.2 CD4-Nrp1 x TCR-HA	27
2.1.3 INS-HA x Rag2-KO.....	27
2.1.4 CD4-Nrp1-KO	27
2.1.5 FIC-Nrp1-KO	28
2.1.6 C57/BL6	28
2.1.7 Balb/c	28
2.2 Zelllinien	28
2.2.1 MT/ <i>ret</i> Melanomzellen	28
2.2.2 CT-26 Darmkrebszellen.....	29
2.2.3 Transgene embryonale Fibroblasten (Maus).....	29
2.3 Chemikalien.....	29
2.4 Puffer, Kulturmedien und Lösungen	30

2.5 Primer.....	32
2.6 Enzyme, Antikörper und Fluorochrome	33
2.7 Kommerzielle Standardsets (<i>Kits</i>)	34
2.8 Geräte	35
2.9 Molekularbiologische Methoden	35
2.9.1 Genotypisierung transgener Mäuse.....	35
2.9.2 Quantitative Realtime RT-PCR.....	36
2.9.3 Genexpressionsanalysen	38
2.10 Zellbiologische Methoden.....	39
2.10.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen	39
2.10.2 Isolierung von CD4 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁻ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen	40
2.10.3 Isolierung von CD11c ⁺ dendritischen Zellen	40
2.10.4 Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i> , FACS).....	41
2.10.5 Aktivierung von T-Zellen <i>in vitro</i>	43
2.10.6 Bestimmung von sezernierten Zytokinen.....	44
2.11 Tierexperimentelle Methoden	44
2.11.1 Intravenöse Injektion von T-Zellen.....	44
2.11.2 INS-HA Modell.....	44
2.11.3 Tumortransplantation.....	45
2.12 Statistik.....	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Untersuchung einer Neuropilin-1 transgenen Maus (CD4-Nrp1).....	46
3.1.1 Neuropilin-1 Expressionsanalysen der CD4-Nrp1 transgenen Maus.....	46
3.1.2 Einfluss der Neuropilin-1 Überexpression in CD4 ⁺ T-Zellen auf die Zusammensetzung der Lymphozyten	49
3.1.3 Die Überexpression von Neuropilin-1 verändert das Genexpressionsprofil von stimulierten CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	51
3.1.4 Neuropilin-1 beeinflusst die Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> , nicht aber ihre inhibitorischen Eigenschaften	53

3.1.5 CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 transgenen Mäusen zeigen ein verändertes Zytokinprofil	55
3.1.6 Einfluss der Überexpression von Nrp1 auf die proliferative Aktivität von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen nach Antigen-spezifischer Stimulation <i>in vitro</i>	56
3.1.7 Die Expression von Neuropilin-1 beeinflusst CD4 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	57
3.2 Untersuchung der Auswirkungen der Deletion von Neuropilin-1 in CD4 ⁺ T Zellen	60
3.2.1 Expression von Neuropilin-1 in CD4-cre x Nrp-1 ^{flox/flox} Mäusen	60
3.2.2 Einfluss der Deletion von Neuropilin-1 auf die Immunzellverteilung	62
3.2.3 Neuropilin-1 wird <i>in vitro</i> nicht für die Treg-vermittelte Suppression benötigt.....	64
3.2.4 Reduziertes Tumorwachstum in CD4-Nrp1KO Mäusen	66
3.2.5 Nrp-1 ⁺ Tregs benötigen VEGF um in den Tumor zu infiltrieren	69
3.2.6 Die spezifische Deletion von Nrp1 auf regulatorischen T-Zellen führt zu reduziertem Tumorwachstum.....	70
3.2.7 Der adoptive Transfer von WT Tregs hebt den Phänotyp des verlangsamten Tumorwachstums in Nrp1-KO Mäusen auf	72
4 Diskussion	75
5 Zusammenfassung.....	86
6 Literatur.....	88
7 Verzeichnisse.....	101
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	101
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	104
7.3 Tabellenverzeichnis.....	106
Danksagung	107
Lebenslauf.....	108
Erklärung.....	110

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Als Immunsystem bezeichnet man die Kombination vielfältiger Mechanismen eines Organismus zur Abwehr von Angriffen durch Pathogene wie Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilze, aber auch zur Erkennung und Eliminierung entarteter körpereigener Zellen (de Visser et al., 2006). Zu den Aufgaben des Immunsystems zählen neben der Erkennung einer Infektion und ihrer Bekämpfung auch die Immunregulation und das immunologische Gedächtnis. In Wirbeltieren unterscheidet man außerdem zwischen Mechanismen der angeborenen (*innate*) Immunität und der spezifischen, erworbenen (*adaptive*) Immunität (Murphy, 2011).

1.1.1 Die angeborene Immunität

Der menschliche Körper ist ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt, zu denen auch Krankheitserreger gehören, die versuchen in das Innere des Körpers einzudringen. Trotzdem kommt es verhältnismäßig selten zu Infektionen, was oft auf die unbemerkte Abwehr durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems in den Oberflächenepithelien zurückzuführen ist, die keine Symptome hervorrufen. Erst wenn ein Pathogen die schützenden Epithelien des Körpers durchbricht, kommt es tatsächlich zu einer Infektion (Murphy, 2011). Die erste Barriere des Immunsystems bilden nun die Makrophagen, die fremde Mikroorganismen anhand spezifischer, konservierter Oberflächenmoleküle, wie Lipopolysaccharide (LPS) von körpereigenen Zellen unterscheiden können und phagozytieren. Diese Phagozytose führt zur Aktivierung der Makrophagen, die daraufhin Zytokine und Chemokine freisetzen, die im Gewebe eine Entzündung hervorrufen und neutrophile Zellen und Plasmaproteine aus dem Blut anlocken (Aderem and Underhill, 1999).

Außerdem führt die Freisetzung von Zytokinen, insbesondere von Interferonen zur Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die über invariante Rezeptoren auf ihrer Oberfläche infizierte Zellen erkennen und in ihnen den programmierten Zelltod auslösen (Scott and Trinchieri, 1995). Die dritte Klasse von phagozytotischen Zellen sind die dendritischen Zellen (engl. *dendritic cell*, DC), die ebenfalls durch die Entzündungsreaktion an den Ort der Infektion gelockt werden. Ihre Hauptaufgabe

besteht aber nicht in der Beseitigung der eingedrungenen Mikroorganismen. DCs reifen nach der Aufnahme des Krankheitserregers heran und wandern in den nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie an ihrer Oberfläche Antigene des Erregers präsentieren, und so in der Lage sind T-Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Sie bilden also als antigenpräsentierende Zellen (engl. *antigen-presenting cell*, APC) ein entscheidendes Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität (Banchereau et al., 2000).

Neben der Abwehr eindringender Pathogene überwachen die Zellen des angeborenen Immunsystems auch die körpereigenen Zellen, um krankhafte Veränderungen der DNA durch Mutationen zu erkennen und veränderte Zellen zu entfernen (Igney and Krammer, 2002).

1.1.2 Die adaptive Immunität

Die Reaktionen der angeborenen Immunität sind also in der Lage eine Infektion oder entartete, körpereigene Zellen entweder erfolgreich zu beseitigen oder zumindest solange einzudämmen, bis es zur Entwicklung einer adaptiven Immunantwort kommt. Dies geschieht zum einen, wenn Makrophagen aufgrund des Zusammentreffens mit Pathogenen oder mutierten körpereigenen Zellen Zytokine und Chemokine ausschütten, die die Infiltration weiterer Immunzellen in das betroffene Gewebe induzieren (de Visser et al., 2006). Sie wird aber auch ausgelöst, wenn eine unreife dendritische Zelle am Ort der Infektion ein Pathogen aufnimmt und intrazellulär prozessiert. Hierdurch kommt es zu ihrer Reifung und sie wandert in die peripheren lymphatischen Gewebe, wo sie Fragmente des aufgenommenen Mikroorganismus mit Hilfe von spezialisierten Glykoproteinen, den MHC-Molekülen (engl. *major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) auf ihrer Oberfläche präsentiert und gleichzeitig co-stimulatorische Moleküle exprimiert, um so über die Ausbildung eines hoch strukturierten Adhäsionskomplexes, der immunologischen Synapse, die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems zu aktivieren (Tordjman et al., 2002).

Diese entstehen im Knochenmark aus einer einzigen Vorläuferzelle, werden dann aber in Abhängigkeit des Ortes ihrer Reifung in zwei Gruppen unterteilt. Während die T-Zellen, die für die zellvermittelte Immunantwort der adaptiven Immunität verantwortlich sind, in den Thymus wandern, um dort heranzureifen und ihn anschließend in den Blutkreislauf zu verlassen, verbleiben die B-Zellen, die in erster Linie die

Antikörperproduktion und somit den humoralen Teil der Immunantwort übernehmen, im Knochenmark und wandern von dort nach Abschluss des Reifungsprozesses in den Blutkreislauf (Ye and Graf, 2007).

Die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems haben sich im Lauf der Evolution weiterentwickelt und tragen auf ihrer Oberfläche Antigenrezeptoren, die nur für jeweils eine einzige chemische Struktur spezifisch sind. Die Vielfalt der unterschiedlichen Antigenrezeptoren wird durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus ermöglicht (V(D)J-Rekombination), durch den während der Lymphozytenentwicklung Millionen unterschiedlicher Varianten der Genprodukte und somit der Rezeptormoleküle entstehen (Grawunder et al., 1998).

B- und T-Zellen reagieren unterschiedlich auf den Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen. Nachdem eine T-Zelle durch den ersten Kontakt mit ihrem Antigen aktiviert wurde, beginnt sie zu proliferieren und differenziert entsprechend ihrer Bestimmung zur zytotoxischen T-Zelle (CTL, eng. cytotoxic T lymphocyte), T-Helferzelle (T_H) oder regulatorischen T-Zelle (Treg). Eine aktivierte B-Zelle bildet durch Proliferation und Differenzierung Plasmazellen, die nun für das Antigen spezifische Antikörper, die sezernierte Form des B-Zellrezeptors, bilden (zusammengefasst nach Janeway's Immunobiology (Murphy, 2011)).

1.2 T-Lymphozyten

Es gibt zwei Untergruppen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen (Teff), die sich durch die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 (CD = engl. *clusters of differentiation*) unterscheiden lassen. CD8-Proteine kommen auf zytotoxischen T-Zellen (CTL) vor, während CD4 auf T-Zellen exprimiert wird, deren Funktion entweder darin besteht andere Zellen zu aktivieren (T_H) oder aber zu regulieren (Treg).

Sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen können ihr Antigen nur binden, wenn es an der Oberfläche einer anderen Zelle von den MHC-Molekülen präsentiert wird. Auch diese lassen sich in zwei Gruppen unterscheiden: Peptide aus dem Zytosol werden an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und von $CD8^+$ T-Zellen erkannt, was zur Eliminierung einer mutierten, körpereigenen Zelle führt, die untypische Gene exprimiert. Auch mit Viren oder bestimmten Bakterien infizierte Zellen werden auf diese Weise von CTLs zerstört. $CD4^+$ T-Zellen hingegen erkennen Peptide, die in Vesikeln entstehen und an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden sind. Neben der

Stimulation durch das spezifische Antigen müssen von der antigenpräsentierenden Zelle weitere costimulatorische Moleküle wie B7 (B7.1/B7.2 = CD80/CD86) exprimiert werden, die an den CD28-Rezeptor der T-Zelle binden. Die Notwendigkeit dieses sekundären Signals dient zum Schutz vor autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie (Banchereau et al., 2000).

1.2.1 CD4⁺ T-Zellen (T_H)

Aus der Population der naiven CD4⁺ T-Zellen entsteht in der Peripherie durch Aktivierung und Differenzierung eine Reihe verschiedener Typen von Effektorzellen, wobei der Typ davon abhängt, welche Signale die Zellen während dieser Prägung erhalten (Murphy, 2011). Neben der Stimulation des T-Zellrezeptors durch das an MHC II gebundene spezifische Antigen und die CD28-abhängige Costimulation über B7-Moleküle, übermittelt die antigenpräsentierende Zelle (APC) weitere Signale, oft in Form von Zytokinen, die die Differenzierung der CD4⁺ T-Zelle steuern (Bour-Jordan and Blueston, 2002; Kapsenberg, 2003). Die entstandenen Subpopulationen von T-Helfer (T_H)-Zellen werden in Abhängigkeit unterschiedlicher Zytokinprofile in T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen unterteilt (Zhu and Paul, 2010).

Die ersten Subpopulationen, die unterschieden wurden, waren T_H1- und T_H2-Zellen (Mosmann et al., 1986). CD4⁺ T-Zellen des T_H1-Phänotyps differenzieren infolge eines Interleukin-12/Interferon gamma (IL-12/IFN- γ) Signals, exprimieren die Transkriptionsfaktoren T-bet (engl. *T-box transcription factor expressed in T cells*) und Stat4 (engl. *signal transducer and activator of transcription 4*) und sekretieren IFN- γ und IL-2 (Zhu and Paul, 2010). Insbesondere bakterielle Infektionen stimulieren DCs und Makrophagen IL-12 zu produzieren, was die Entstehung von T_H1-Zellen begünstigt, die wiederum weitere Makrophagen aktivieren, welche für die Beseitigung der Bakterien benötigt werden (Murphy, 2011).

T_H2-Zellen sekretieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, ihre Differenzierung wird von IL-4 ausgelöst, was zur Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3 und Stat6 (engl. *signal transducer and activator of transcription 5*) führt (Zhu and Paul, 2010). Die von T_H2-Zellen sekretierten Zytokine wiederum führen eine humorale Immunantwort der B-Zellen herbei, die speziell IgM, IgA und IgE (Ig=Immunglobulin) Antikörper produzieren (Murphy, 2011).

Sowohl T_H1- als auch T_H2-Zellen spielen auch eine wichtige Rolle im Verlauf der anti-Tumor Immunantwort. Während T_H1-Zellen für die Aktivierung von CD8⁺ CTLs

verantwortlich sind, die Tumorzellen direkt eliminieren, stimulieren T_H2 -Zellen die humorale Immunantwort und somit die Produktion von spezifischen Antikörpern gegen TAAs (Tumor-assoziierte Antigene) und TSAs (Tumor-spezifische Antigene) (Igney and Krammer, 2002).

Erst 2005 wurden T_H17 -Zellen als dritte Subpopulation der $CD4^+$ Effektor T-Zellen beschrieben (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Sie entstehen infolge einer Stimulation in Gegenwart von IL-6 und TGF- β (engl. *transforming growth factor beta*), was zur Expression von ROR γ t (engl. *retinoid related orphan receptor*) und Stat3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) führt, was wiederum die Expression der Rezeptoren für IL-21 und IL-23 induziert (Zhou et al., 2007). IL-21 und IL-23 induzieren dann, zusammen mit TGF- β , die Sekretion von IL-17, IL-6 und TNF (Tumor Nekrose Faktor) (Zhou et al., 2007). T_H17 -Zellen spielen eine entscheidende Rolle sowohl in der Immunabwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen als auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen (Chen and O'Shea, 2008).

Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor T-Zellen bringt Veränderungen mit sich, was sich u.a. auch in der veränderten Expression von Oberflächenmolekülen wie CD69 zeigt, die auch als Marker für die Identifizierung von aktivierten T-Zellen dienen. Außerdem kommt es zu einer Reduktion in der Expression von CD62L, welches für die Wanderung von Lymphozyten in die Lymphknoten benötigt wird (Hengel et al., 2003).

1.2.2 $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL, engl. *cytotoxic T lymphocyte*)

$CD8^+$ T-Zellen sind von großer Wichtigkeit für den Schutz gegen Viren, intrazelluläre Bakterien und Tumorzellen (Zhang et al., 2009). Sie werden ebenfalls im naiven Zustand aus dem Thymus entlassen und müssen einen 1 bis 3 Tage dauernden Aktivierungsprozess durchlaufen, bevor sie als Effektor T-Zellen zytotoxische Aktivität entwickeln (Russell and Ley, 2002). Dafür bedarf es neben der Stimulation des T-Zellrezeptors durch das spezifische, durch MHC I von einer professionellen APC präsentierte Antigen, außerdem der Co-Stimulation durch die Interaktion von CD80/CD86 auf der APC mit ihrem Liganden CD28, welcher auf $CD8^+$ T-Zellen exprimiert wird (Schoenberger et al., 1998). Im Verlauf vieler viraler Infektionen bedarf es des Weiteren der indirekten Stimulation durch eine $CD4^+$ T-Zelle des Typ 1, die zeitgleich an dieselbe APC binden muss (Andreasen et al., 2000). Auch die

Differenzierung zur CD8⁺ Effektor T-Zelle führt zur Veränderung ihres Phänotyps. Aktivierte CTLs exprimieren z.B. auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 (engl. *lymphocyte function-associated antigen 1*) und ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*), die für die Stabilisierung des Kontaktes mit der Zielzelle essenziell sind (Russell and Ley, 2002). Außerdem wird auch auf CD8⁺ T-Zellen u.a. die Expression des Glykoproteins CD69 induziert, welches als Signal-übertragender Rezeptor in die Proliferation und Funktion von Lymphozyten involviert ist (Cambiaggi et al., 1992).

Aufgrund der phänotypischen Veränderungen führt das Zusammentreffen von Effektor CD8⁺ T-Zellen mit dem MHC I/Antigen-Komplex auf einer infizierten oder Tumorzelle dann auch in Abwesenheit von APCs und CD4⁺ T-Zellhilfe zur Ausschüttung von Perforinen, die die Zellmembran der Zielzelle für Granzyme durchlässig machen, die ebenfalls von CTLs sekretiert werden. Diese induzieren in der Zielzelle durch ihre proteolytische Aktivität den programmierten Zelltod. Außerdem können zytotoxische CD8⁺ T-Zellen durch die Expression von Fas Ligand (FasL, CD95L) auf ihrer Oberfläche Apoptose in Fas (CD95)-exprimierenden Zellen auslösen (Barry and Bleackley, 2002; Barry et al., 2000).

1.2.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Neben der Population der CD4⁺ Helfer T-Zellen wurde im Jahr 1971 zum ersten Mal beschrieben, dass es in der Thymozytenpopulation Zellen gibt, die einen immunsuppressiven Effekt besitzen (Gershon and Kondo, 1971). Zwar gab es in den Folgejahren weitere Studien, die sich mit diesen „Suppressor“ T-Zellen beschäftigten, doch führte die allgemeine Skepsis gegenüber dieser Theorie dazu, dass erst im Jahre 1995 zum ersten Mal die Subpopulation von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen beschrieben wurde, die anerge und suppressive Funktion zeigte, und deren Depletion in der Maus zu schweren Autoimmunerkrankungen führte (Sakaguchi et al., 1995). Hierbei handelt es sich um die regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (Tregs), von denen man inzwischen weiß, dass sie neben der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) außerdem charakteristisch den Transkriptionsfaktor *Forkhead Box Protein 3* (Foxp3) exprimieren, der sowohl für ihre Entwicklung als auch für ihre Funktion unersetzlich ist (Fontenot et al., 2003). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Immunantworten und Immuntoleranz sowie in der Kontrolle der klonalen Expansion von autoreaktiven T-Zellen (periphere Toleranz)

und verhindern so die Entstehung und das Voranschreiten von Autoimmunerkrankungen und Immunpathologien (Sakaguchi, 2005; Sakaguchi et al., 2006). Sie infiltrieren aber auch in Tumorgewebe, wo sie durch Tumor-assoziierte Antigene oder vom Tumor exprimierte Selbst-Antigene aktiviert werden und spezifische anti-Tumor Immunantworten unterdrücken (Nishikawa and Sakaguchi, 2010).

Ähnlich wie in CD4⁺ Helfer T-Zellen, ist die Funktion von Tregs (z.B. die Suppression von Immunantworten) von einer Antigen-spezifischen Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes abhängig. Sind sie aber einmal ausreichend aktiviert, erfolgt ihre weitere regulatorische Funktion Antigen-unspezifisch (Sakaguchi et al., 1995; Thornton and Shevach, 2000). Die Treg Population in der Peripherie ist eine sehr heterogene Gruppe von Zellen mit unterschiedlichen Ursprüngen ihrer Entwicklung (Murphy, 2011). Von ihnen stellen die natürlichen, aus dem Thymus stammenden Tregs (nTregs) mit 5-10 % der Gesamt CD4⁺ Population den größten Anteil dar. Sie besitzen die Fähigkeit sowohl die Aktivierung und Funktion von Effektor T-Zellen als auch von Antigen-präsentierenden Zellen wie DCs und B-Zellen und Makrophagen zu unterdrücken (Schmetterer et al., 2012). Für die Induktion ihrer Proliferation *in vitro* reicht die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes nicht aus, sondern es ist außerdem die Zugabe einer hohen Dosis IL-2 erforderlich (Thornton and Shevach, 1998). In *in vitro* Co-Kulturen mit naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sind sie aber in der Lage deren Proliferation und Zytokinproduktion sehr effizient auf eine Zell-Zell-Kontakt-abhängige Weise zu unterdrücken (Oberle et al., 2007; Sakaguchi et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 aus der Familie der *forkhead/winged-helix* Transkriptionsfaktoren wird von 95 % der nTregs exprimiert (Roncador et al., 2005) und gilt als „Master Regulator“ für ihre Entwicklung und suppressive Funktion (Fontenot et al., 2003). Die Entdeckung einer Mutation im *foxp3* Gen in der *scurfy* (sf) Mauslinie lieferte Anhaltspunkte über die Funktion von Foxp3 in Tregs (Brunkow et al., 2001). So litten männliche Mäuse, die hemizygot für die X-Chromosom-gekoppelte *Foxp3^{sf}* Mutation waren an CD4⁺ T-Zell-abhängigen, lymphoproliferativen Erkrankungen, charakterisiert durch körperliche Schwäche und die Infiltration von Lymphozyten in alle Organe (Lyon et al., 1990) was innerhalb der ersten drei Lebenswochen zum Tode führt. CD4⁺ T-Zellen aus diesen Mäusen reagieren hypersensibel auf TCR-Stimulation und produzieren verstärkt IL-2 (Clark et al., 1999). Im Menschen führt die Mutation im orthologen *foxp3* Gen zur Erkrankung an vielfältigen Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes und Allergien, dem sogenannten

IPEX-Syndrom (engl. *Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrom*) (Bennett et al., 2001).

Während inzwischen weithin akzeptiert wurde, dass es sich bei den natürlichen Tregs um eine eigene T-Zelllinie handelt, konnte ihr eindeutiger Phänotyp bisher noch nicht geklärt werden (Schmetterer et al., 2012). Zwar wird CD25 als erster bekannter Treg-Marker konstitutiv auf allen nTregs exprimiert und allgemein für die Isolierung von Tregs verwendet, jedoch wird CD25 auch auf aktivierten Effektor T-Zellen transient hochreguliert, so dass man, insbesondere im Verlauf einer Immunantwort, immer von einer Kontamination der Treg-Population durch aktivierte T_H-Zellen ausgehen muss (Schmetterer et al., 2012). Da Foxp3 als Transkriptionsfaktor intrazellulär exprimiert wird, werden für die Charakterisierung und Manipulation von Tregs weitere Oberflächenmoleküle benötigt, die möglichst ausschließlich auf Tregs, unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus exprimiert werden sollten (Bruder et al., 2004). Zwei weitere Oberflächenmarker für die Untersuchung von regulatorischen T-Zellen sind *Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4* (CTLA-4) (Takahashi et al., 2000) und der Glucocorticoid-induzierte Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor (GITR) (McHugh et al., 2002). CTLA-4 ist ein strukturelles Homolog des costimulatorischen CD28-Rezeptors und bindet mit erhöhter Affinität an CD80 und CD86, so dass die beiden costimulatorischen Moleküle für T-Zellen nicht mehr zugänglich sind (Buonavista et al., 1992; Linsley et al., 1991). GITR gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und soll negativ regulierend auf die Funktion von Effektor T-Zellen wirken (Shimizu et al., 2002). Beide Moleküle werden zwar konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen exprimiert, werden aber auch auf CD4⁺ Helfer T-Zellen nach Aktivierung hochreguliert (Linsley et al., 1992), was sie als alleinigen Treg-Marker unbrauchbar macht.

Weitere Marker, die stark suppressive Subpopulationen von Tregs definieren sind das *latency-associated peptide* (LAP) (Chen et al., 2008), welches die aminoterminal Domäne des *transforming-growth-factor-beta* (TGF- β) Vorläuferpeptids bildet und der E-Cadherin Ligand CD103 (McHugh et al., 2002), der sonst hauptsächlich auf T-Zellpopulationen des mukosalen Epithelium exprimiert wird (Kilshaw and Murant, 1990), aber auch an der Akkumulation und Verweilung sowie an der Infiltration von Tregs in den Tumor beteiligt ist (Anz et al., 2011; Suffia et al., 2005). Da diese beiden Marker aber nur auf ca. 30 % der Foxp3-positiven CD4⁺ T-

Zellen exprimiert werden, sind auch sie nur mäßig für die Identifikation von Tregs von Nutzen.

Im Jahr 2004 konnte Neuropilin-1 (Nrp1) als Oberflächenmarker für murine regulatorische T-Zellen identifiziert werden (Bruder et al., 2004). Seine Expression in Tregs korreliert positiv mit der Expression von Foxp3 und ihrer suppressiven Funktion. Des Weiteren kommt es in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen auch nach Aktivierung nicht zur Expression des Oberflächenrezeptors. Im humanen System wurde mit GARP (engl. *glycoprotein-A repetitions predominant*) ein Oberflächenmarker auf Tregs identifiziert, der nach TCR-Aktivierung auf Tregs, nicht aber auf T_H -Zellen hochreguliert wird (Probst-Kepper et al., 2009).

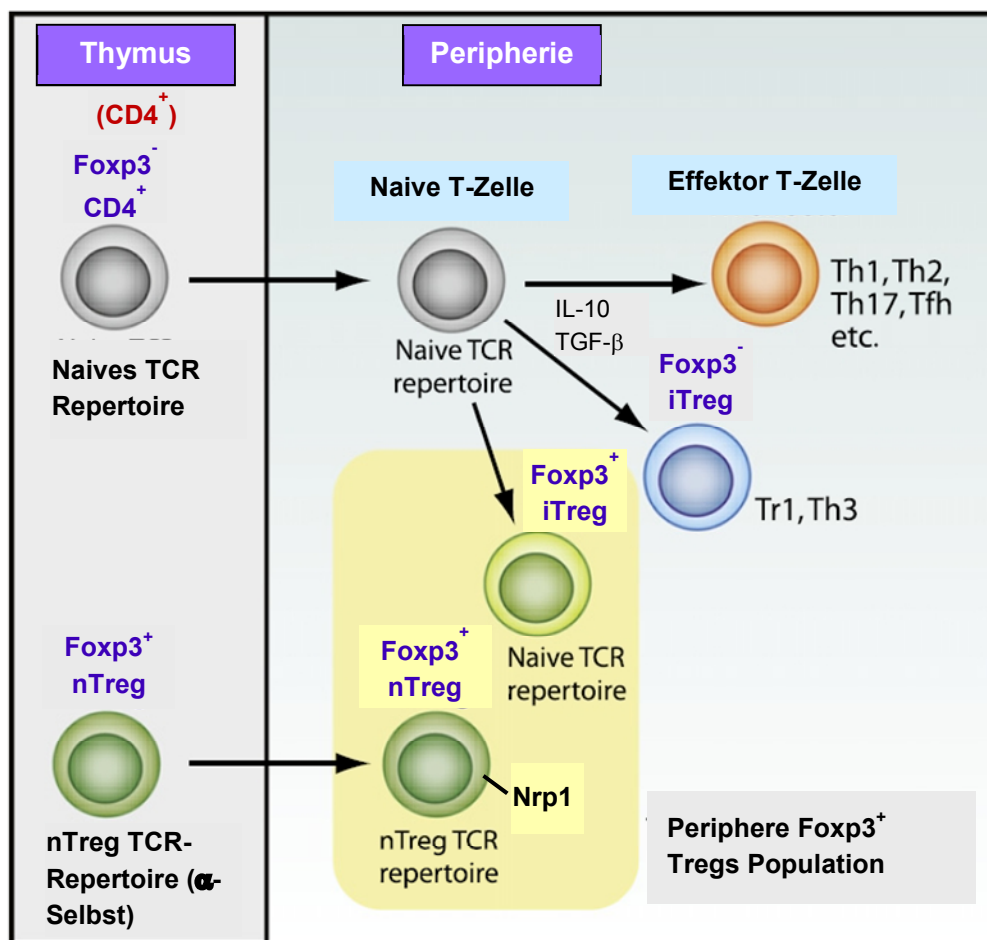


Abb. 1.1: Entstehung von regulatorischen T-Zellen im Thymus und in der Peripherie. Natürliche Tregs (nTregs) differenzieren im Thymus und wandern von dort in die Peripherie aus. Induzierte Tregs (iTregs) entstehen in der Peripherie aus naiven $CD4^+$ T-Zellen. (Modifiziert nach Curotto de Lafaille und Lafaille 2009)

Neben den natürlichen, aus dem Thymus stammenden nTregs wurde aber noch eine weitere Population regulatorischer T-Zellen identifiziert (Abb. 1.1), die induzierten

oder adaptiven CD4⁺ regulatorischen T-Zellen (iTregs), die außerhalb des Thymus unter einer Vielzahl unterschiedlicher Bedingungen entstehen und sich wiederum in mehrere Subpopulationen unterteilen lassen (Bilate and Lafaille, 2012). So werden CD4⁺Foxp3⁺ iTregs in der Peripherie aus CD4⁺CD25⁻ naiven T-Zellen entweder durch T-Zellaktivierung in Abwesenheit einer Entzündungsreaktion oder unter inflammatorischen Bedingungen zusammen mit T_H-Zellen, aber in geringerem Maße, induziert (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Expressionsanalysen zeigten, dass die Expression von IL-10 dabei hochreguliert wird (Haribhai et al., 2011). CD4⁺Foxp3⁺ iTregs exprimieren aber im Gegensatz zu nTregs kein Nr1p1, welches somit den ersten Marker darstellt, der nTregs von iTregs zumindest mukosalen Ursprungs in gesunden Mäusen unterscheidet (J. Weiss, M. Gobert, A.M. Bilate, M. Curroto de Lafaille, J.J. Lafaille, et al., unveröffentlichte Daten (Bilate and Lafaille, 2012). Mit Hilfe eines Kolitis-Modells in immunodefizienten Mäusen (Mottet et al., 2003) konnte gezeigt werden, dass iTregs für einen ausreichenden Schutz der Tiere vor einer Erkrankung absolut notwendig sind (Haribhai et al., 2009). Transferiert man naive T-Zellen (welche die Vorläufer der für die Kolitis verantwortlichen Zellen enthalten) in diese Mäuse, kann durch den Co-Transfer von nTregs die Entstehung der Kolitis verhindert werden. Transferiert man aber naive T-Zellen aus Foxp3-defizienten Mäusen, reicht der Co-Transfer von nTregs nicht aus, um die Tiere vor der Erkrankung zu schützen, da aus den Foxp3-defizienten T-Zellen in der Peripherie keine iTregs entstehen können. In diesem Fall kann eine Erkrankung der Tiere erst durch den Co-Transfer von nTregs und *in vitro* generierten iTregs vollständig verhindert werden, was für ein Hand-in-Hand Arbeiten beider Subpopulationen spricht (Haribhai et al., 2009).

CD4⁺Foxp3⁻ regulatorische T-Zellen des Typ 1 (Tr1)-Zellen entstehen durch die chronische Stimulation naiver, nicht-regulatorischer T-Zellen in Anwesenheit von IL-10 (Groux et al., 1997). Sie sekretieren ein bestimmtes Muster von Zytokinen, vornehmlich hohe Mengen an IL-10 und in der Regel nur geringe Mengen an TGF- β und IL-5. Außerdem besitzen sie *in vivo* suppressive Kapazität und sind in der Lage, die Entstehung von T_H1-vermittelten Immunerkrankungen, wie Kolitis, zu verhindern. Die dritte Population der adaptiven Tregs, die CD4⁺Foxp3⁻ T_H3-Zellen, wurden zuerst aus Mäusen isoliert, in denen zuvor durch die orale Applikation geringer Mengen Antigen eine Toleranz erzeugt wurde (Chen et al., 1994). Die Mehrheit dieser Zellen produziert TGF- β , geringere Mengen an T_H2 Zytokinen (IL-10, IL-4) und ist in der

Lage die Induktion einer Experimentellen Autoimmunencephalitis (EAE) *in vivo* zu unterdrücken. Im Laufe der Zeit konnten noch weitere Foxp3-negative Treg-Populationen mit suppressivem Potenzial generiert werden. So entstanden z.B. bei der Behandlung von T-Zellen mit einer Kombination aus den Immunsuppressiva Vitamin D3 und Dexamethason *in vitro* regulatorische T-Zellen, die aber nicht dem Tr1- oder T_H3-Phänotyp zugeordnet werden konnten (Barrat et al., 2002). Und auch die chronische Antigen-Stimulation *in vivo* induziert eine Population von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen, deren genetisches Programm sich klar von dem natürlicher Tregs unterscheidet, die aber sowohl *in vitro* als auch *in vivo* regulatorisches Potenzial besitzen (Hansen et al., 2007).

Neben den CD4⁺ regulatorischen T-Zellen findet man sowohl im Menschen als auch in der Maus eine Population Thymus-gereifter CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, die ebenfalls suppressive Fähigkeiten besitzen und deren molekularer Phänotyp dem von CD4⁺ nTregs stark ähnelt (Bienvenu et al., 2005; Cosmi et al., 2003; Fontenot et al., 2005).

1.2.4 Suppressionsmechanismen von Tregs

Fast zwei Jahrzehnte nach ihrer Charakterisierung werden die regulatorischen T-Zellen nun als primäre Vermittler der peripheren Toleranz betrachtet. Doch während sie durch diese Funktion die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes (Sakaguchi et al., 2001) oder Multiple Sklerose (Viglietta et al., 2004) verhindern können, blockieren sie auch die erfolgreiche Abwehr einiger Pathogene, indem sie eine ausreichende Immunantwort unterdrücken (Rouse et al., 2006), und können darüber hinaus die anti-Tumor Immunität beeinträchtigen (Zou, 2006). Deshalb besteht großes Interesse daran, die Mechanismen, über die Tregs Regulation vermitteln, möglichst genau zu identifizieren und zu charakterisieren. Nach dem momentanen Stand der Forschung, können diese entsprechend ihrer Wirkweise in vier Arten von Suppressionsmechanismen unterteilt werden (Abb. 1.2 (Workman et al., 2009)). Die Sekretion inhibitorischer Zytokine, insbesondere IL-10, TGF- β und IL-35 wird als Hauptmechanismus der Suppression verstanden (Thornton and Shevach, 1998). Denn obwohl gezeigt wurde, dass eine erfolgreiche Regulation der Zielzelle *in vitro* Zell-Zell-Kontakt abhängig ist, gibt es inzwischen eine Reihe von *in vivo* Studien, die zeigen, wie wichtig von Tregs sezerniertes IL-10, TGF- β und IL-35 für die Suppression unterschiedlicher immunologischer Prozesse ist (Sojka et al., 2008).

Möglicherweise wirken die von Tregs sekretierten Zytokine Gradienten-abhängig, was eine gewisse Nähe zwischen Suppressor- und Responderzelle erfordern würde (Shevach, 2009).

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Induktion der Zytolyse der Zielzelle. Dies geschieht in humanen Tregs über die Expression von Granzym A (GzmA) auf der Oberfläche und die Zerstörung der Zielzelle über Perforin-abhängige, Fas - Fas-Ligand-unabhängige Zytolyse (Grossman et al., 2004). Genexpressionsanalysen muriner Tregs zeigten, dass in diesen die Expression von Granzym B (GzmB) hochreguliert wird (McHugh et al., 2002) und dass GzmB-defiziente Tregs reduzierte suppressive Kapazität *in vitro* aufweisen (Gondek et al., 2005), ansonsten aber eine GzmB-abhängige, Perforin-unabhängige Zytolyse vermitteln. Cao et al. konnten diese Ergebnisse in einem Tumormodell 2007 auch *in vivo* bestätigen (Cao et al., 2007).

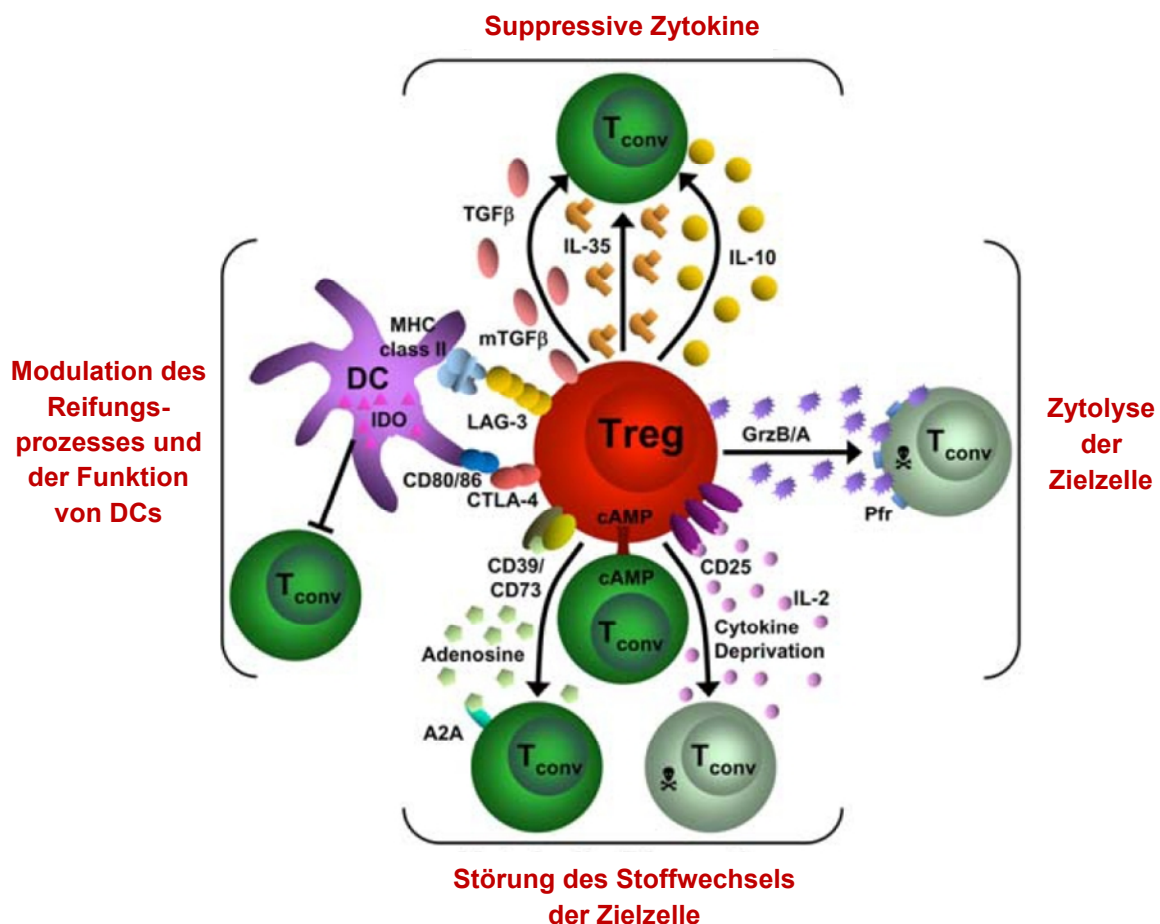


Abb. 1.2: Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen. Dargestellt werden die vier grundlegenden Mechanismen der Treg Funktion: Suppression durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine; Zytolyse der Zielzelle durch Granzym und Perforin; Störung des Metabolismus der Zielzelle; Modulation der Reifung und Funktion von DCs. (Modifiziert nach Workman et al. 2009)

In den letzten Jahren wurden einige Suppressionsmechanismen beschrieben, die man unter dem Begriff des Eingreifens in den Stoffwechsel zusammenfasst (Workman et al., 2009). Zunächst wird vermutet, dass die konstitutive Expression von CD25 auf Tregs zu einer Bindung von IL-2 und damit zu einem Mangel des für die Differenzierung von T-Zellen benötigten pro-inflammatorischen Zytokins kommt (Thornton and Shevach, 1998). Jüngeren Studien zufolge kommt es aber auch in Abwesenheit von IL-2 zu einer Treg-vermittelten Suppression von Effektor T-Zellen (Oberle et al., 2007), so dass es hier noch weiterer Untersuchungen bedarf. Hingegen konnte gezeigt werden, dass Tregs über die Oberflächenenzyme CD39 und CD73 perizelluläres Adenosin generieren, welches T-Zellen durch Bindung an den Adenosinrezeptor 2A (A2AR) inhibiert (Deaglio et al., 2007). Interessanterweise kommt es neben der Inhibition der Zielzell-Funktionen auch zu einer Verminderung der Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 und zu erhöhter TGF- β Produktion, was wiederum die Bildung von iTregs verstärkt (Zarek et al., 2008). Ferner wurde gezeigt, dass Tregs intrazellulär cAMP (engl. cyclic adenosinmonophosphate) über *gap junctions* („Kommunikationskontakte“) in die Zielzelle transportieren und so die Proliferation und IL-2 Synthese unterdrücken (Bopp et al., 2007).

Zusätzlich zu den Mechanismen der direkten Einwirkung von Tregs auf die Funktion von Effektor T-Zellen, können sie auch die Reifung und/oder Funktion von DCs modulieren, welche für die Aktivierung der T-Zellen benötigt werden (Vignali et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass die Blockierung des konstitutiv auf Tregs exprimierten CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) zu einer Reduktion der Treg-vermittelten Suppression *via* DCs kommt (Oderup et al., 2006), vermutlich durch die Bindung an CD80/CD86, welche als costimulatorische Moleküle für die T-Zellaktivierung benötigt werden. Des Weiteren können Tregs in DCs über einen CTLA-4/CD80/CD86-abhängigen Mechanismus die Expression vonIDO (engl. *indoleamine 2,3-dioxygenase*) induzieren, welches in T-Zellen die Produktion von pro-apoptotischen Molekülen der Tryptophan-Verstoffwechselung bewirkt (Fallarino et al., 2003; Mellor and Munn, 2004).

Zusammengefasst stellen diese Mechanismen ein breites Spektrum an Möglichkeiten für Tregs bereit, die periphere Toleranz aufrechtzuerhalten und spiegeln damit die Vielfältigkeit der Zelltypen und unterschiedlichen anatomischen und pathogenen Bedingungen wider, auf die regulatorische T-Zellen Einfluss

nehmen können. Die Ergebnisse von *in vitro* Analysen deuten darauf hin, dass es für die effiziente Suppression durch Tregs zum Zell-Zell-Kontakt oder aber zumindest zu einer räumlichen Annäherung zwischen Tregs und Effektorzellen kommen muss. Daher müssen Tregs *in vivo* in der Lage sein, in die unterschiedlichsten Regionen des Körpers einzuwandern, um den für die Suppression benötigten Kontakt mit Effektor T-Zellen herstellen zu können (von Boehmer, 2005). So konnte gezeigt werden, dass nur Tregs, die in der Lage sind in die Lymphknoten des Pankreas einzuwandern und dort zu proliferieren, die Kapazitäten haben, durch ihren Transfer in diabetische Mäuse den Diabetes zu verhindern oder zu unterbinden (Jaeckel et al., 2005; Tang et al., 2004). Dafür exprimieren Tregs auf ihrer Oberfläche L-Selektin (CD62L), was sie dazu befähigt wie naive T-Zellen im Körper zwischen Blut und Lymphe zu rezirkulieren. Durch Aktivierung können Tregs ihr migratorisches Verhalten verändern, und wie Effektor T-Zellen in entzündetes Gewebe einwandern (von Boehmer, 2005). Kontinuierlich aktivierte CD4⁺CD25⁺ Tregs in der Maus werden positiv für CD103 ($\alpha\text{E}\beta_7$ Integrin), das ihnen ermöglicht in das betroffene Gewebe oder einen Tumor zu infiltrieren und T-Zellen zu supprimieren (Anz et al., 2011; Huehn et al., 2004). Tregs inhibieren also nicht nur die frühe Proliferation von T-Zellen sondern modulieren auch ihre Funktion während der Immunantwort direkt im Gewebe. Die Migration von Tregs an den Ort des Geschehens repräsentiert also eine essenzielle Eigenschaft, die ihnen die Regulation von Immunantworten in den unterschiedlichsten Stadien ermöglicht. Daher könnte die Analyse der Mechanismen, die der Migration zugrunde liegen, eine Möglichkeit bieten, unerwünschtes Eingreifen von Tregs z.B. im Verlauf einer Immuntherapie zu unterbinden.

1.3 Neuropilin-1

Neuropilin-1 (Nrp1) ist ein 130 kDa großes Transmembranglykoprotein, welches aus fünf Domänen besteht: drei extrazellulären Domänen (a1a2, b1b12 und c), die die Ligandenbindung und die Homo- oder Heterodimerisierung übernehmen, einer kurzen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne, die ein PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) Bindemotiv enthält (Abb. 1.3 (Ellis, 2006)). Neuropilin-1 wurde zuerst im Nervensystem des Krallenfrosches *Xenopus laevis* identifiziert (Takagi et al., 1987), wo es insbesondere während der Entwicklung der Axone in der Kaulquappe exprimiert wird (Fujisawa et al., 1995). Wenig später wurde in der Maus gezeigt, dass Nrp1 als Co-Rezeptor von Plexin-A1 für Klasse 3 Semaphorine in sich entwickelnden

sensorischen Axonen fungiert (He and Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). Sowohl die Überexpression unter der Kontrolle des β -Aktin Promotors als auch die homozygote Deletion von Nrp1 in der Maus führt zu Schädigungen des

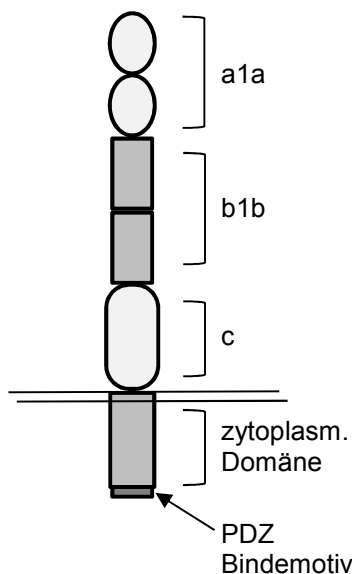


Abb. 1.3 Struktur von Neuropilin-1. Nrp1 besteht aus drei extrazellulären Domänen (a1a2, b1b2 und c), einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, welche ein PDZ Bindemotiv besitzt. (Modifiziert nach: (Ellis, 2006)).

Nervensystems und des Herz-Kreislauf-Systems, die bereits in der Embryonalentwicklung tödlich sind (Kitsukawa et al., 1997; Kitsukawa et al., 1995).

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass Nrp1 auch auf Endothel- und Tumorzellen exprimiert wird, wo es VEGF₁₆₅ bindet oder aber als Corezeptor die Bindung von VEGF₁₆₅ an seinen Rezeptor KDR (engl. *kinase insert domain receptor*) verstärkt (Soker et al., 1996; Soker et al., 1998). Die Co-Expression von Nrp1 und KDR in Endothelzellen führt zu einer erhöhten migratorischen Aktivität dieser Zellen entlang eines VEGF₁₆₅ Gradienten. 2008 wurde außerdem Galectin-1 (Gal-1) als weiterer Ligand von Nrp1 auf Tumor-assoziierten Endothelzellen des Plattenepithelkarzinoms identifiziert, wo die Gal-1 – Nrp1 Interaktion die Migration und Adhäsion der Endothelzellen vermittelt sowie die VEGFR-2 (engl. *vascular endothelial growth receptor 2*) Phosphorylierung verstärkt (Hsieh et al., 2008). Ebenfalls 2008

postulierten Glinka und Prud'homme, dass außerdem sowohl TGF- β als auch LAP-TGF- β (engl. *latency-associated-peptide TGF- β* , die inaktive Form des Zytokins) an Nrp1 binden, und dass Nrp1 sowohl auf T-Zellen als auch auf Tumorzellen LAP-TGF- β aktivieren kann (Glinka and Prud'homme, 2008).

Im Immunsystem wurde erstmals 2002 eine Expression von Nrp1 auf humanen dendritischen Zellen und T-Zellen gezeigt (Tordjman et al., 2002). Bei der Entstehung von Zell-Zell-Kontakten zwischen DC und T-Zelle kommt es zur Polarisation von Nrp1 zusammen mit spezifischen Oberflächenmolekülen in der hochstrukturierten immunologischen Synapse und die Blockierung von Nrp1 auf T-Zellen oder DCs durch blockierende Antikörper führt zu verminderter Proliferation der T-Zellen *in vitro* (Tordjman et al., 2002). Einige Jahre später zeigten Mitglieder derselben Forschergruppe, dass auch Semaphorin3A (Sema3A) im humanen

System an der Entstehung von Immunantworten beteiligt ist, und dass die Interaktion von Sema3A und Nr1 auf humanen T-Zellen eine Rolle als später negativer Regulationsmechanismus der Immunantwort spielt (Lepelletier et al., 2006).

Im Zuge von Genexpressionsstudien an murinen T-Zellen, konnte Nr1 als spezifischer Oberflächenmarker auf CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen der Maus identifiziert werden (Bruder et al., 2004). CD4⁺Nr1^{high}, nicht aber CD4⁺Nr1^{low} T-Zellen besitzen *in vitro* suppressive Fähigkeiten und die Expression des Treg-Markers Foxp3 sowie anderer Treg-assoziiierter Moleküle, wie PD-1 (engl. *programmed cell-death 1*), $\alpha\text{E}\beta_7$ (CD103) und CTLA-4 korreliert mit der Nr1 Expression in der Population der CD4⁺Nr1^{high} Zellen (Bruder et al., 2004).

Wenig später konnte auch im humanen Lymphknoten eine Population von Nr1-positiven, stark suppressiven Tregs identifiziert werden, die selbst anerg sind und die Proliferation und Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels eines Zellkontakt-abhängigen, mit der Expression von Foxp3 einhergehenden Mechanismus unterdrücken (Battaglia et al., 2007). Zwar konnte auch eine sehr kleine Population von CD4⁺Nr1⁺ nicht-regulatorischen T-Zellen im menschlichen peripheren Blut identifiziert werden, doch zeigten diese keine Expression von CD25 und Foxp3 (Battaglia et al., 2007). Gegensätzliche Ergebnisse postulierten Milpied *et al.* 2009: Sie zeigten, dass weder humane Foxp3-positive CD4⁺ T-Zellen noch Foxp3-negative CD4⁺ T-Zellen sowohl aus dem Blut als auch aus Thymus, Lymphknoten oder den Mandeln, Nr1 exprimieren (Milpied et al., 2009). Da es aber durch *in vitro* Stimulation und in reaktiven sekundären lymphoiden Organen zu verstärkter Nr1-Expression kommt, schließen Milpied *et al.* eine Beteiligung von Nr1 an der T-Zell – DC Interaktion oder einen intrinsischen regulatorischen Effekt durch die Expression von Membran-gebundenem TGF- β nicht aus.

Im murinen Immunsystem konnte gezeigt werden, dass Nr1 auf Tregs eine Schlüsselrolle bei der Entstehung langanhaltender Interaktionen zwischen DCs und Tregs spielt (Sarris et al., 2008). Während die Blockierung von Nr1 die Häufigkeit längerer Interaktionen reduzierte, führte die ektopische Expression von Nr1 in CD4⁺ naiven T-Zellen zu einem Anstieg der langanhaltenden Interaktionen, zur Entstehung von immunologischen Synapsen und erhöhte außerdem die Sensibilität der T-Zellen gegenüber ihrem spezifischen Antigen, auch in Abwesenheit pro-inflammatorischer Signale (Sarris et al., 2008). Daraus schließen die Autoren, dass Tregs in Abwesenheit einer Entzündung einen Vorteil gegenüber naiven T-Zellen haben, da

sie aufgrund der Expression von Nrp1 länger an DCs binden und so eine Aktivierung der T-Zellen verhindern (Abb. 1.4) Des Weiteren wurde demonstriert, dass DCs den

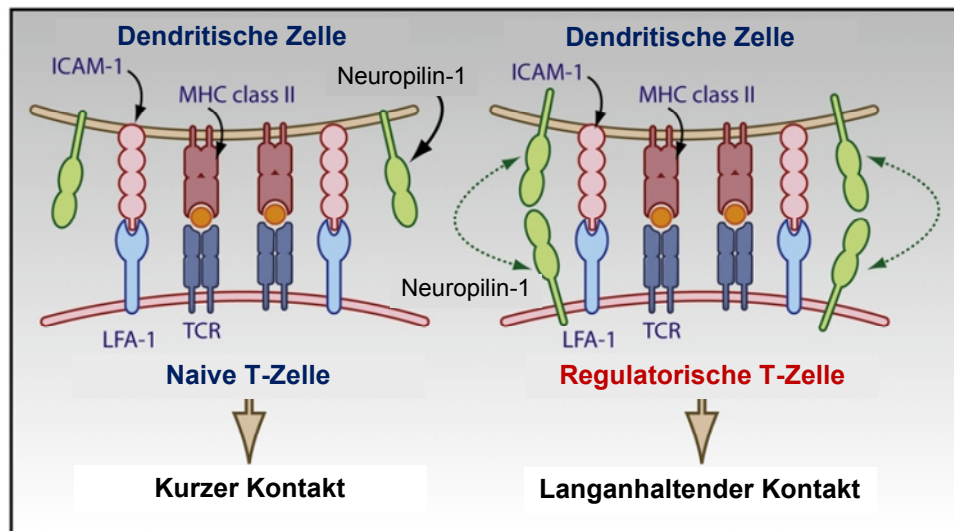


Abb. 1.4: Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen haben Tregs durch die Expression von Nrp1 auf der Zelloberfläche gegenüber naiven T-Zellen einen Vorteil bei der Interaktion mit DCs. Der Kontakt zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle wird durch die Interaktion von T-Zellrezeptor und MHC II Molekül vermittelt. Außerdem interagiert LFA-1 (engl. *lymphocyte function-associated antigen 1*) mit ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*). Durch homotypische Interaktionen könnte Nrp1 die Dauer des Kontakts zwischen DC und Treg erhöhen. (Modifiziert nach Mizui und Kikutani 2008)

Nrp1 - Plexin-A1 Rezeptorkomplex exprimieren und in Abhängigkeit von Sema3A in das Lymphsystem einwandern (Takamatsu et al., 2010)

Im murinen Modell für Multiple Sklerose (MS), der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), ergaben sich weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Nrp1 an der Regulation von $CD4^+$ T-Zell-vermittelten Immunantworten. Hier konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Nrp1 in $CD4^+$ T-Zellen zu einem milderem Krankheitsverlauf der EAE führt, während die T-Zell-spezifische Deletion ($Nrp1^{flx/flx} \times CD4Cre$) eine Verschlimmerung der Symptome zur Folge hat (Solomon et al., 2011). Neben seiner Funktion in der Entwicklung des Nervensystems und der Vaskularisierung scheint Neuropilin-1 also auch an verschiedensten Vorgängen im Immunsystem beteiligt zu sein, so dass weitere Untersuchungen der Funktionen des Rezeptors, insbesondere auf regulatorischen T-Zellen, wichtig sind.

1.4 Regulatorische T-Zellen in der Tumorentstehung

Die Population der regulatorischen T-Zellen ist in der Lage eine Homöostase des Immunsystems zu erhalten, in der es zu einer Bekämpfung eindringender Pathogene

kommt, apathogene Substanzen, wie z.B. Nahrungsmittelbestandteile und Selbst-Antigene aber keine Aktivierung von Immunzellen auslösen.

Doch was passiert, wenn körpereigene Zellen zu gefährlichen, unkontrolliert proliferierenden Tumorzellen entarten? In der Regel erkennt das Immunsystem diese malignen Zellen insbesondere aufgrund ihrer Expression von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) (de Visser et al., 2006). Trotzdem entwickeln Tumorzellen oft unterschiedliche Strategien, um dem Immunsystem zu entkommen (Poschke et al., 2011) und Krebs, eine der drei häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern, entsteht. Unter den bekannten Mechanismen spielen Tregs eine wichtige Rolle bei der Suppression von T-Zellantworten gegen Tumore und sind somit eines der ersten Ziele einer erfolgreichen Immuntherapie (Dunn et al., 2004; Sakaguchi, 2005). So konnte z.B. gezeigt werden, dass die systemische Depletion von $CD25^+$ T-Zellen durch die Gabe von $CD25$ -spezifischen Antikörpern (PC61) das Wachstum einiger sonst sehr progressiv wachsender Tumore in Mäusen supprimieren kann (Shimizu et al., 1999). Studien ergaben außerdem eine Korrelation zwischen reduzierten Treg Zahlen und reduziertem Tumolvolumen (Yu et al., 2005). Diese Ergebnisse bestätigten sich in etlichen Maus Tumormodellen (Golgher et al., 2002; Jones et al., 2002; Steitz et al., 2001; Tanaka et al., 2002). Des Weiteren konnte durch die Verabreichung von Zyklophosphamid, das $CD4^+CD25^+$ Tregs aus dem Tumor entfernt, nicht aber Helfer T-Zellen und CTLs, eine Population von TAA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen aktiviert und so eine anti-Tumor Immunantwort induziert werden (Ercolini et al., 2005). Eine direkte Verbindung zwischen Tregs und reduzierter anti-Tumor Immunität zeigten auch Experimente mit adoptiv transferierten T-Zellen, in denen B16 Melanom-tragende Mäuse Tumor-spezifische $CD8^+$ T-Zellen erhielten. Der Co-Transfer von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, nicht aber von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen führt hier zu einer Unterdrückung der $CD8^+$ T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen den Tumor (Antony et al., 2005).

Aufgrund dessen, dass Tumore im Menschen in der Regel erst in späten Stadien entdeckt werden, gibt es über die Rolle der regulatorischen T-Zellen in humanen Tumoren bisher deutlich weniger Erkenntnisse. Untersuchungen ergaben jedoch erhöhte Treg Zahlen im Blut von Patienten die an den unterschiedlichsten Krebsformen, wie Lungenkrebs, Brustkrebs, Leukämie, Ovarialkrebs, Darmkrebs, Hautkrebs und anderen Tumorentitäten litten (Zou, 2006). Hohe Treg Zahlen korrelierten häufig mit einem schlechten Krankheitsverlauf (Nishikawa and

Sakaguchi, 2010). Tregs aus der Mikroumgebung humaner Ovarialtumore exprimieren Foxp3, inhibieren CD8⁺ T-Zell-vermittelte Zytotoxizität und führen zu erhöhtem Tumorwachstum in einem chimären Mausmodell (Curiel et al., 2004).

Erhöhte Treg Zahlen und eine reduzierte Anzahl an CD8⁺ T-Zellen werden also direkt mit der unzureichenden Immunantwort gegen Tumore in Verbindung gebracht. Doch wie gelangen die T-Zellen in den Tumor und was geschieht dort mit ihnen? Eine Möglichkeit ist, dass proliferierende und absterbende Tumorzellen große Mengen an Selbst-Antigenen bilden, die von Tregs erkannt werden und zu ihrer Rekrutierung führen (Nishikawa et al., 2005). Des Weiteren wurde postuliert, dass Tumorzellen und infiltrierende Makrophagen das Chemokin CCL22 (C-C Motiv Ligand 22) produzieren, welches von CD4⁺CD25⁺ Tregs erkannt wird, da sie den entsprechenden Rezeptor CCR4 exprimieren und dadurch ebenfalls in den Tumor rekrutiert werden (Curiel et al., 2004).

Neben der Rekrutierung können CD4⁺ regulatorische T-Zellen auch in der Tumor-Mikroumgebung induziert werden. Es wurde gezeigt, dass Tumorzellen DCs anregen können, TGF-β zu produzieren, welches als Co-Stimulator die Proliferation von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs antreibt (Ghiringhelli et al., 2005). Außerdem sekretieren Tumorzellen selbst TGF-β und IL-10, welche naive CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺Foxp3⁺ Tregs konvertieren können (Jacobs et al., 2012; Liu et al., 2007; Yuan et al., 2011). Regulatorische T-Zellen spielen also eine kritische Rolle in der Kontrolle von anti-Tumor Immunantworten, indem sie in das betroffene Gewebe einwandern und dort sowohl durch Tumor-assoziierte Antigene als auch Selbst-Antigene aktiviert werden und proliferieren (Nishikawa and Sakaguchi, 2010).

Um die Effizienz von Immuntherapien gegen Krebs zu verbessern und andere mögliche therapeutische Ansätze zu entwickeln, sind weitere Untersuchungen sowohl der Tumor-Antigene als auch des Verhaltens von Zellen des Immunsystems unerlässlich. Insbesondere die Induktion und die Rekrutierung von Tregs in Tumoren und deren Umgebung, sowie in Regionen aktiver Immunantworten bedürfen sorgfältiger Charakterisierung.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

CD4⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) sind von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen sowie für die Regulation der Immunantworten gegenüber Fremd-Antigenen. Allerdings können sie auch wichtige Immunreaktionen z.B. bei der Bekämpfung von Tumoren verhindern und ihre Fehlfunktion kann zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes oder Multipler Sklerose führen. Deshalb kommt der Charakterisierung von Tregs und den zugrundeliegenden Suppressionsmechanismen eine große Bedeutung zu.

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass Neuropilin-1 (Nrp1) spezifisch auf murinen CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimiert wird (Bruder et al., 2004). Die Nrp1 Expression auf Tregs korreliert mit der Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 und ihrer suppressiven Kapazität *in vitro*, so dass Nrp1 einen geeigneten Oberflächenmarker für die Identifikation von Tregs und für ihre Unterscheidung von aktivierten T-Zellen repräsentiert. Allerdings ist die Rolle von Nrp1 in der CD4⁺ T-Zellbiologie bislang weitgehend unverstanden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Funktion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen näher zu untersuchen. Dafür standen zwei Mausmodelle zur Verfügung. Zum einen eine im Vorfeld neu generierte CD4-Nrp1 transgene Maus, die Nrp1 unter der Kontrolle des CD4 Promotors überexprimieren soll, und zum anderen eine Nrp1^{flox/flox} Maus, die sich durch Verpaarung mit geeigneten Cre-Mäusen (CD4-Cre oder Foxp3-IRES-Cre) durch die fehlende Expression in T-Zellen bzw. Tregs auszeichnet.

Zunächst soll die CD4-Nrp1 transgene Mauslinie im Hinblick auf die modulierte Nrp1 Expression untersucht werden. Anschließend soll analysiert werden, inwieweit sich die verstärkte, T-Zell-spezifische Nrp1 Expression auf die Entwicklung und den molekularen, sowie den funktionellen Phänotyp der T-Zellen *in vitro* und *in vivo* auswirkt. Darüber hinaus soll mit Hilfe der Nrp1^{flox/flox} Maus die Nrp1 Expression spezifisch in T-Zellen und in Foxp3⁺ Tregs ausgeschaltet werden. Nach Verifizierung der T-Zell-spezifischen Nrp1 Deletion soll untersucht werden, ob sich dies auf die immunsuppressive Funktion von Tregs auswirkt und in welchem Maße sich die funktionellen Eigenschaften der Nrp1-defizienten T-Zellen *in vivo* verändern. Somit sollen die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen Aufschluss über die Rolle von Nrp1 in der T-Zellbiologie geben.

2 Material und Methoden

2.1 Mauslinien

Die verwendeten Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einheit des UK Essen unter SPF-Bedingungen (SPF = speziell Pathogen-frei) in IVC2-Käfigen (IVC = engl. *individually ventilated cage*) gehalten und waren bei Verwendung mindestens sechs Wochen alt. Zum Ausschluss mikrobieller Kontaminationen wurden alle drei Monate Sentinel-Mäuse einer histologischen, serologischen und parasitologischen Gesundheitsüberprüfung durch ein externes Labor unterzogen.

2.1.1 CD4-Nrp1 x Thy 1.1

Transgene CD4-Nrp1 Mäuse exprimieren die *nrp1* cDNA unter der Kontrolle des CD4 Promotors und tragen außerdem den T-Zell-spezifischen Marker CD90.1 (Thy 1.1).

2.1.2 CD4-Nrp1 x TCR-HA

CD4-Nrp1/TCR-HA doppeltransgene Mäuse wurden durch die Verpaarung von CD4-Nrp1 Mäusen mit TCR-HA Mäusen (Kirberg et al., 1994) gezüchtet, die einen Klasse II MHC-bezogenen, HA-spezifischen T-Zellrezeptor exprimieren.

2.1.3 INS-HA x Rag2-KO

INS-HA/Rag2-KO doppeltransgene Mäuse exprimieren das Influenza Hemagglutinin unter der Kontrolle des Ratten Insulinpromotors (INS-HA, (Lo et al., 1992)). Außerdem besitzen sie keine reifen B- und T-Zellen, da eine Mutation im rekombinationsaktivierenden Gen 2 (*recombination activating gene 2, rag2*) zu einer unzureichenden Aktivität der für die V(D)J Genumlagerung benötigten Rekombinase führt.

2.1.4 CD4-Nrp1-KO

Die CD4-Nrp1-KO Maus (Nrp1-KO) basiert auf dem "Cre/loxP-System", welches die gezielte Modifikation oder Deletion von DNA-Sequenzen in bestimmten Organen

oder Zellpopulationen erlaubt. Hierfür wird die zu deletierende DNA-Sequenz mit zwei gleich orientierten loxP-Stellen flankiert, die wiederum durch die exprimierte Cre-Rekombinase (Cre = *cyclization recombination*) erkannt, verknüpft und herausgeschnitten werden. CD4-cre Mäuse (von Werner Müller, Manchester, UK (Lee et al., 2001)) wurden mit Nrp1^{flox/flox} Mäusen (von David Ginty, Baltimore, USA (Gu et al., 2003)) verpaart (CD4-cre x Nrp1^{flox/flox}), um eine spezifische Deletion der *nrp1* Sequenz in T-Zellen zu erreichen.

2.1.5 FIC-Nrp1-KO

FIC-Nrp1-KO Mäuse exprimieren eine “IRES-Cre”-Sequenz (*internal ribosome entry site*, IRES) unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors (Fox-IRES-Cre, FIC, (Wing et al., 2008)) was zu einer spezifischen Deletion der loxP-flankierten *nrp1* Sequenz (Nrp1^{flox/flox}) in allen Foxp3-positiven Zellen führt.

2.1.6 C57/BL6

C57/BL6 Mäuse wurden von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen.

2.1.7 Balb/c

Balb/c Mäuse wurden von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen.

2.2 Zelllinien

2.2.1 MT/*ret* Melanomzellen

MT/*ret* Melanomzellen stammen aus Mäusen, die das *ret* Transgen unter der Kontrolle des Metallothionein Promotors exprimieren und im Alter von ca. 2 Monaten spontan Melanome entwickeln (Dr. Nakashima, Japan). Immortalisierte MT/*ret* Zellen wurden von Iris Helfrich, Essen, zur Verfügung gestellt.

2.2.2 CT-26 Darmkrebszellen

Bei der CT-26 Zelllinie handelt es sich um eine N-nitroso-N-methylurethane induzierte, undifferenzierte Colon Karzinom Zelllinie. CT-26 Zellen wurden in IMDM Komplettmedium bei 37°C/5 % CO₂ kultiviert und 2- bis 3-mal pro Woche gesplittet, so dass eine Konfluenz von ca. 70 % nicht überschritten wurde.

2.2.3 Transgene embryonale Fibroblasten (Maus)

Transgene, embryonale Fibroblasten der Maus (*mouse embryonic fibroblast*, MEF) wurden von Christian Stockmann, Essen, zur Verfügung gestellt (Stockmann et al., 2008). Sie stammen aus C57/BL6 Mäusen, in denen beide Allele des Exons 3 des Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors A (*vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A) durch loxP-Stellen flankiert sind (VEGF^{+/+}). Die Deletion von VEGF wurde durch adenovirale Expression der Cre Rekombinase erreicht, um so äquivalente Wildtyp (VEGF^{+/+}, mit Kontroll-Adenovirus infiziert) und VEGF-KO (VEGF^{-/-}, mit Cre-Rekombinase exprimierendem Adenovirus infiziert) Tumorzelllinien zu erhalten.

2.3 Chemikalien

Tabelle 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biobudget, Krefeld
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampli Taq 10-fach Reaktionspuffer	Applied Biosystems, Darmstadt
AutoMACS Pro Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
AutoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Collagenase Typ D	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethyldicarbonat-Wasser (DEPC-H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, USA
Deoxyribonuclease (Dnase) I Typ II	Sigma-Aldrich, USA
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching

Chemikalie	Hersteller
Gentamycin	PAA Laboratories, Pasching
Go Taq Flexi 5-fach Puffer	Promega, Mannheim
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Merckle GmbH, Blaubeuren
Ionomycin	Sigma, Hamburg
Kaliumdihydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Lineares Polyacrylamid (LPA)	Ambion, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega, Mannheim
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, USA
MML V-RT 5-fach Puffer	Promega, Mannheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Sigma, Hamburg
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, Hamburg
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Stain	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Sigma, Hamburg

2.4 Puffer, Kulturmedien und Lösungen

ACK-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 9,98 mM KHCO ₃ 0,5 M EDTA pH 8 pH auf 7,2 – 7,4 einstellen, sterilfiltrieren
DNA-Ladepuffer (6-fach)	10 mM Tris (pH 7,5) 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol FF 60 % Glycerin 60 mM EDTA
FACS-Puffer	2 % (v/v) FCS 2 mM EDTA 1-fach PBS-Puffer
PBS/EDTA-Lösung	1-fach PBS-Puffer

	50 mM EDTA
PBS-Puffer	136 mM NaCl 2,68 mM KCl 8,09 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 1,47 mM KH ₂ PO ₄
TBE-Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2,53 mM EDTA
TE-Puffer (10/1)	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
IMDM-Komplettmedium	„Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium“ mit GlutaMAX™-I und 25 mM Hepes 10 % hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin 25 µM 2-Mercaptoethanol
RPMI1640-Komplettmedium	„Roswell Park Memorial Institute“-Medium mit GlutaMAX™-I und 25 mM Hepes 10 % hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Trypanblau-Lösung	0,5 g Trypanblau 0,9 g NaCl ad 100 ml H ₂ O
Collagenase/DNase-Lösung	1 mg/ml Collagenase Typ D 10 µg/ml DNase I Typ II 1-fach FACS-Puffer

<i>Tail-Puffer</i>	100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
	200 mM NaCl
	0,2 % SDS
	5 mM EDTA

2.5 Primer

Alle Oligonukleotide stammen, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Eurofins MWG Operon (Invitrogen, Karlsruhe). Für die cDNA-Synthese wurden Oligo (dT) Primer (0,5 µg/µl) und Random Primer (3,0 µg/µl) der Fa. Invitrogen verwendet.

Tab. 2.2 Oligonukleotide

a) Realtime-PCR

Oligonukleotid	Sequenz	Annealing Temperatur (T _A)
RPS9 5' mm	5'- TCATCCGCCAACGTCACATCAG -3'	52°C - 58°C
RPS9 3' mm	5'- GGGCGGCCCCACCATAAGG -3'	
IL-2 5' mm	5'- TGAGTGCCAATTCGATGATGAGT -3'	55°C
IL-2 3' mm	5'- TATTGAGGGCTTGTTGAGATGATGC -3'	
Lck 5' mm	5'- GCACGTGAGTCTAAGCCTTGGATA -3'	58°C
Lck 3' mm	5'- TTCCGGGCACAGGACAGAAC -3'	

b) Typisierungs-PCR

Oligonukleotid	Sequenz	Annealing Temperatur (T _A)
Cre	5'- ACGACCAAGTGACAGCAATG -3' 5'- CTCGACCAGTTTAGTTACCC -3'	60°C
FIC	5'- TGTGTGATAGTGCCCGTGGTTC -3' 5'- TTCGCAAGAAGAGGAGCCAACG -3'	61°C
FIC wt	5'- CTGCTTCCTTCACGACATTCAAC -3' 5'- AAGTGCTTTGTGCGAGTGGAGAGC -3'	61°C
INS-HA	5'- GGCTACCATGCGAACAATTCAACCG -3' 5'- CTCCGTCAGCCATAGCAAATTTCTG -3'	55°C
Nrp1 ^{flx}	5'- AGGCCAATCAAAGTCCTGAAAGACAGTCCC -3' 5'- AAACCCCCTCAATTGATGTTAACACAGCCC -3'	63°C

Oligonukleotid	Sequenz	Annealing Temperatur (T _A)
Nrp1 ExonB	5'- GTCTTCAGGGCCCTTTCTCTTCAT -3' 5'- TGCTATTGCGCTGTCAGTGTAATAA -3'	58°C
Nrp1 ProA	5'- GCTCAGATTCCCAACCAACAA -3' 5'- GCGGCCGCTTCATTCTC -3'	58°C
Rag2	5'- ATGTCCCTGCAGATGGTAACA -3' 5'- GCCTTTGTATGAGCAAGTAGC -3'	57°C
Neo	5'- GCTATTCGGCTATGACTGGG -3' 5'- GAAGGCGATAGAAGGCGATG -3'	57°C
TCR-HA	5'- CCTGAACTGGGGATTCTACTCTTCC -3' 5'- AGTCAGCTTATTATTGCCTCCACTC -3'	58°C

2.6 Enzyme, Antikörper und Fluorochrome

Tab. 2.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Ampli Taq Gold Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
Go Taq Hot Start Polymerase	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
RNase H minus point mutant	Promega, Mannheim

Tab. 2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Epitop (Anti-Maus-)	Fluorophor	Klon	Hersteller
CD3e	ungekoppelt	145-2C11	BD Pharmingen
CD4	APC	RM4-5	BD Pharmingen
	FITC	GK1.5	BD Pharmingen
	PE	H129.19	BD Pharmingen
	PB	RM4-5	BD Pharmingen
CD8	APC	53-6.7	BD Pharmingen
	FITC	53-6.7	BD Pharmingen
	PE	53-6.7	BD Pharmingen
	PB	53-6.7	BD Pharmingen
CD11b	PE	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	APC	HL3	BD Pharmingen
CD25	APC	PC61	BD Pharmingen

Epitop (Anti-Maus-)	Fluorophor	Klon	Hersteller
CD25	Biotin	7D4	BD Pharmingen
	FITC	7D4	BD Pharmingen
	PE	PC61	BD Pharmingen
CD28	ungekoppelt	37.51	BD Pharmingen
CD62L	Biotin	MEL-14	BD Pharmingen
CD69	Biotin	H1.2F3	BD Pharmingen
	FITC	H1.2F3	BD Pharmingen
CTLA-4 (CD152)	PE	UC10-4F10-11	BD Pharmingen
F4/80	PB	BM8	Invitrogen
Foxp3	PE	FJK-16s	eBioscience
GITR	PE	DTA-1	BD Pharmingen
GzmB	APC	GB12	Invitrogen
IFN- γ	PE	XMG1.2	BD Pharmingen
IL-2	PE	JES6-5H4	BD Pharmingen
Nrp1	APC		R&D Systems
TCR-HA	FITC		Eigene Herstellung
Streptavidin (SavPE)	PE		BD Pharmingen
Streptavidin (SavAPC)	APC		BD Pharmingen

Tab. 2.5 Verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Abkürzung	Absorption (nm)	Emission (nm)
Allophycyanin	APC	633	660
R-Phycoerythrin	PE	488	575
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488	525
Pacific Blue®	PB	405	455

2.7 Kommerzielle Standardsets (*Kits*)

CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD11c MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
CFSE: Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.8 Geräte

Tab. 2.6 Geräte

Gerät	Hersteller
AutoMACs	Miltenyi Biotec
Blutzuckermessgerät + Teststreifen	Roche
Brutschrank (Hera cell 150)	Thermo Electron Corporation
FACS (BD LSR II)	BD Biosciences, Heidelberg
FACS (BD ARIA II)	BD Biosciences, Heidelberg
GelDoc Station	Intas
Gellaufkammer	Whatman
Nanodrop Photometer	Peqlab
Realtime PCR-System (7500 Fast Real-Time PCR-System)	Applied Biosystems
Sicherheitswerkbank Klasse II (MSC-Adantage)	Thermo Scientific
Sterilbank	Biosan
Thermocycler (T3000 Thermocycler)	Biometra
Thermoblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf
Vortexer (MS3 basic)	Ika
Waage (CP2202S)	Sartorius
Zentrifuge (Multifuge 3SR+)	Thermo Scientific
Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Genotypisierung transgener Mäuse

Zur Genotypisierung transgener Mäuse wurden PCR-Amplifikationen mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien durchgeführt. Die Transgen-spezifischen Primerpaare sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Reaktionsansatz:

x ng	genomische DNA
1-fach	Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
1,5 mM	MgCl ₂
1 mM	dNTP Mix (2,5 mM jedes Nukleotid)
5 µM	Vorwärtsprimer

5 μ M	Rückwärtsprimer
0,5 U	GoTaq Hot Start Polymerase
ad 20 μ l	H ₂ O steril

Hiermit wurde folgendes PCR-Amplifikationsprogramm im Thermocycler durchgeführt:

<u>95°C</u>	<u>10 Minuten</u>	10 Zyklen
95°C	30 Sekunden	
T _A	90 Sekunden	
<u>72°C</u>	<u>90 Sekunden</u>	
95°C	15 Sekunden	27 Zyklen
T _A	45 Sekunden	
72°C	90 Sekunden	

Mittels Agarosegelelektrophorese konnte anschließend anhand der spezifischen Produktgrößen der PCR der Genotyp der Mäuse bestimmt werden.

2.9.2 Quantitative Realtime RT-PCR

Für die Ermittlung der Expression von IL-2 und Lck auf mRNA-Ebene wurde die Gesamt-RNA aus 1×10^6 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Milzen von WT und CD4-Nrp1 Mäusen im naiven Zustand oder aber nach 48-stündiger *in vitro* Aktivierung unter Anwendung des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen, Hilden, nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend erfolgte eine Fällung der RNA durch Zugabe von 1 μ l LPA (5 mg/ml), 0,5 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 Vol. eiskaltem, absolutem Ethanol bei -80°C für mindestens eine Stunde. Nach mehrmaligem Waschen mit 80%-igem Ethanol wurde die RNA anschließend luftgetrocknet, in 13 μ l DEPC H₂O resuspendiert und für die reverse Transkription zur cDNA (*complementary* DNA)-Synthese eingesetzt. Hierfür wurden zunächst Oligo(dT)- und Random Hexamer-Primer zugegeben, für 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Reaktionsansatz:

13 μ l	RNA
0,5 μ l (0,25 μ g)	Oligo(dT)-Primer
0,5 μ l (1,5 μ g)	Random Hexamer Primer

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des Mastermixes für die reverse Transkription:

4 µl (1-fach)	5-fach M-MLV-Reverse Transkriptase-Puffer
1 µl (2,5 mM)	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl (200 U)	M-MLV Reverse Transkriptase

Die enzymatische Reaktion verlief im Thermocycler bei 42°C für 60 Minuten und wurde durch das anschließende Erhitzen des Ansatzes für 5 Minuten auf 90°C abgestoppt. Nach der Konzentrationsbestimmung der cDNA im Nanodrop wurde diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die quantitative Real-Time PCR wurden die cDNA Proben mit den entsprechenden Primern und dem SYBR Green PCR Master Mix versetzt, der neben dem Fluoreszenzfarbstoff auch die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs und die benötigten Pufferkomponenten enthält:

~ 20 ng	cDNA
10 µl (1-fach)	10-fach Power SYBR Green PCR Master Mix
50 – 900 mM	Vorwärtsprimer
50 – 900 mM	Rückwärtsprimer
ad 20 µl	H ₂ O steril

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus einem Gemisch aller eingesetzten Proben wurde eine Eichkurve erstellt. So konnten anhand der gemessenen CT (engl. *cycle threshold*, Fluoreszenzschwellenwert)-Werte die relativen Template-Konzentrationen bestimmt werden. Diese wurden auf das gleichzeitig analysierte *housekeeping* Gen *rps9* (ribosomales Protein S9) normalisiert, welches unabhängig von Zelltyp und Aktivierungsstatus konstitutiv exprimiert wird. Die Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale während der Amplifikation erfolgte mit einem 7500 Fast Real-Time PCR System und wurde im Anschluss mit der „7500 Fast System Software“ (Applied Biosystems) analysiert.

Programm der quantitativen Real-Time PCR:

<u>95°C</u>	<u>10 Minuten</u>	} 40 Zyklen
95°C	15 Sekunden	
55°C	1 Minute	
<u>72°C</u>	<u>1 Minute</u>	
95°C	15 Sekunden	
60°C +	1 Minute (Schmelzkurve)	
95°C	15 Sekunden	

2.9.3 Genexpressionsanalysen

Für vergleichende Transkriptomanalysen mittels „*Agilent gene expression chip*“-Technologie (Kooperation mit Dr. Robert Geffers, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Milzen von WT und CD4-Nrp1 Mäusen am FACS (engl. *fluorescence activated cell sorter*) Aria II durchflusszytometrisch sortiert und 48 Stunden in Gegenwart von α -CD3- und α -CD28 Antikörpern aktiviert oder umgehend bei -80°C gelagert. Anschließend wurde die RNA entsprechend des Protokolls „RNeasy animal cells“ (Qiagen, Hilden) extrahiert, zum Verdau kontaminierender DNA mit DNase behandelt und ihre Konzentration und Qualität mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) elektrophoretisch ermittelt. Nun erfolgte die Umschreibung von RNA in cDNA und dann in Cy3-markierte cRNA nach dem Protokoll des „Quick Amp Labeling Kit, one-color“ der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der cRNA und die Markierung durch Cy3 wurden mittels Nanodrop (PEQLAB, Erlangen) bestimmt. Anschließend wurden von jeder Probe 1,6 µg Cy3-markierter cRNA auf den Genchip „G4122F whole mouse genome microarray 4 44 K 60mer“ 16 Stunden bei 65°C hybridisiert (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Nach der Hybridisierung und dem Waschen erfolgte das Scannen des Genchips auf dem „DNA Microarray Scanner“ mit „Surescan high Resolution“ gemäß Herstellerangaben (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Signalintensitäten wurden mit der „Feature Extraction Software 10.5“ unter Berücksichtigung der empfohlenen Einstellungen durch den Hersteller (GE1_105_Dec08, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert und mit der „Genespring Software GX10“ (Agilent Technologies, Santa

Clara, USA) ausgewertet. Die Rohsignalintensitäten wurden normalisiert (Skalierung auf den Median aller Proben).

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

Für die Durchführung der unterschiedlichen Analysen und Experimente wurden zunächst Lymphozyten aus dem Blut und unterschiedlichen Organen der Maus isoliert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zentrifugationsschritte in einer Zellkulturzentrifuge (Multifuge 3SR+) der Firma Thermo Scientific für 10 Minuten bei 300 x g und 4°C durchgeführt.

2.10.1.1 Milz

Nach der Entnahme wurden Milzen durch die Injektion von 5 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer (ACK-Puffer) gespült und die Zellsuspension zur Entfernung von Gewebestücken und zur Vereinzelung der Zellen durch ein 100 µm Mikrosieb (BD Falcon™ cell strainer) gefiltert. Im Anschluss an den nachfolgenden Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in einer adäquaten Menge FACS-Puffer resuspendiert und gezählt.

2.10.1.2 Lymphknoten (LNs)

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus mesenterialen (mLN), inguinalen (iLN), axillaren (aLN) bzw. drainierenden (dLN) Lymphknoten, wurden diese nach der Präparation durch ein 100 µm Mikrosieb (BD Falcon™ cell strainer) gedrückt, zentrifugiert und in einer adäquaten Menge FACS-Puffer aufgenommen.

2.10.1.3 Blut

Das Blut der Versuchstiere wurde umgehend nach der Tötung mit einer mit Heparin (1:100 in PBS) benetzten Einmal-Feindosierungsspritze direkt aus dem Herzen entnommen und in ein, mit 200 µl Heparin (1:100 in PBS) befülltes, 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Blut-Heparin-Gemisch wurde anschließend mit ACK-Puffer auf 1,5 ml aufgefüllt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 Minuten bei 500 x g und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Es folgten

1-2 weitere Inkubationsschritte mit 1 ml ACK-Puffer bis zur nahezu vollständigen Entfernung der Erythrozyten und ein Waschschrift mit 1,5 ml FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen im benötigten Volumen FACS-Puffer aufgenommen.

2.10.1.4 Tumor

Die transplantierten Tumore wurden zu den angegebenen Zeitpunkten präpariert und in eiskaltem RPMI-Medium ohne weitere Zusätze gelagert. Anschließend wurden sie zusammen mit dem Medium in ein 100 µm Mikrosieb (BD Falcon™ cell strainer) in einer Petrischale überführt, in sehr kleine Stücke geschnitten, durch das Sieb gedrückt, und das Sieb mit PBS-Puffer nachgespült. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 3 ml ACK-Puffer resuspendiert, für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit FACS-Puffer verdünnt und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in einer adäquaten Menge FACS-Puffer aufgenommen.

2.10.2 Isolierung von CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Die Isolierung von T-Zellen aus den Einzelzellsuspensionen erfolgte mittels MACS® Technologie unter Anwendung des autoMACS® Pro Separators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Das „CD4⁺ T Cell isolation kit, mouse“ und das „CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell isolation kit, mouse“ wurden gemäß Herstellerangaben verwendet. Für die Isolierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurde dem Antikörpergemisch des „CD4⁺ T Cell isolation kit, mouse“ außerdem je Probe 1 µl α-CD25 Biotin-gekoppelter Antikörper hinzugefügt.

2.10.3 Isolierung von CD11c⁺ dendritischen Zellen

Um CD11c-positive Zellen aus der Milz zu isolieren, wurde zunächst 1 ml einer Collagenase/DNase-Lösung (s. 2.4) in die Milz injiziert, die Milz anschließend in kleine Stücke geschnitten und in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml der Collagenase/DNase-Lösung für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Danach wurde die Lösung inklusive aller Gewebestücke auf ein 100 µm Mikrosieb (BD Falcon™ cell strainer) überführt, hindurchgedrückt und mit FACS-Puffer gewaschen. Nun wurden unter Anwendung von „CD11c MicroBeads, mouse“ die CD11c⁺ Zellen gemäß Herstellerangaben über positive Selektion am autoMACS® Separationssystem (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert.

2.10.4 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS)

Im FACS LSR II (BD Bioscience, Heidelberg) können Zellpopulationen anhand ihrer biophysikalischen Eigenschaften (Größe, Granularität) und der Expression spezifischer Proteine identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Zum Nachweis spezifischer Markermoleküle werden Fluorophor-markierte Antikörper eingesetzt (Tab. 2.4). Im Durchflusszytometer selbst werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser einzeln vorbeigeführt. Die Streuung des Lichts durch jede Zelle dient hierbei als Maß für ihre Größe und Granularität. Die freigesetzte Emission der ebenfalls durch unterschiedliche Laser angeregten, über Antikörper an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe wird ebenfalls detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Alle Signale werden von einem Computer aufgenommen und mit Hilfe einer Software (FACS Diva, BD Bioscience, Heidelberg oder Flowjo, Tree Star Inc., USA) dargestellt. Hierbei wurden Zellzahlen und Größen- und Granularitätswerte linear, Fluoreszenzintensitäten logarithmisch aufgetragen.

2.10.4.1 Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse

Für die Färbung von Oberflächenproteinen wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und mit den entsprechenden Antikörpern für 10 Minuten bei 4°C (α -Nrp1-APC 30 Minuten bei Raumtemperatur) im Dunkeln inkubiert. Bei Bedarf erfolgte eine intrazelluläre Färbung im Anschluss an die Oberflächenfärbung. Die Zellen wurden hierfür mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit Fix/Perm (eBioscience) für 2 Stunden (Foxp3 und CTLA-4) bzw. 30 Minuten (GzmB) bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die permeabilisierten Zellen wurden dann mit 1-fach Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gewaschen und für 30 Minuten mit Foxp3-, CTLA-4- oder Gzmb-Antikörper in FACS-Puffer im Dunkeln gefärbt und abschließend in FACS-Puffer aufgenommen.

2.10.4.2 Sortieren von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Um Zellpopulationen voneinander zu separieren, wurden Zellen mit entsprechenden Antikörpern markiert und am FACS Aria II Sorter (BD Bioscience, Heidelberg) unter Verwendung der Diva Software in IMDM Komplettmedium sortiert.

2.10.4.3 CFSE-Markierung von Lymphozyten

Für die Analyse der proliferativen Aktivität von Lymphozyten *in vitro*, wurden diese mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) markiert, welcher passiv in das Zellinnere eindringt und dort irreversibel an Zellproteine bindet. Bei jeder Teilung der Zellen halbiert sich die Fluoreszenzintensität des CFSE-Signals, so kann über ihre Abnahme die Proliferationsrate bestimmt werden. Da es sich hierbei um einen sehr lichtempfindlichen Farbstoff handelt, wurden alle Schritte der Markierung in einem angedunkelten Raum durchgeführt. Hierfür wurden die zu markierenden Zellen zunächst in 2 ml IMDM ohne Zusätze aufgenommen und mit 2 ml CFSE-Färbelösung (2 ml IMDM ohne Zusätze + 1 μ l CFSE) gründlich durchmischt (entspricht einer CFSE-Endkonzentration von 2,5 μ M). Es folgte eine Inkubation für 8 Minuten bei 37°C im Dunkeln, danach die Zugabe von 4 ml FCS und ein erneuter Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurde die Zellsuspension mit IMDM-Komplettmedium gewaschen, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die markierten Zellen in der entsprechenden Menge IMDM-Komplettmedium aufgenommen.

2.10.4.4 Proliferationstest

Zur Bestimmung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen aus CD4-Nrp1 und WT sowie Nrp1-KO und Nrp1-WT Mäusen, wurden CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen unter Anwendung der autoMACS® Technologie isoliert, CFSE gefärbt und jeweils 2 x 10⁵ Zellen je 200 μ l IMDM-Komplettmedium pro Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. Eine Stimulation erfolgte über die Zugabe von 1 μ g/ml α -CD3 löslich für 72 Stunden bei 37°C. Als Kontrolle dienten unstimulierte, CFSE-markierte Zellen aus WT oder Nrp1-WT Mäusen. Die proliferative Aktivität wurde über die Abnahme des CFSE-Farbstoffes im FACS bestimmt.

2.10.4.5 Proliferationstest Antigen-spezifisch

Für die Analyse der Proliferation nach Antigen-spezifischer Stimulation *in vitro*, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus TCR-HA und CD4-Nrp1 x TCR-HA Mäusen unter Anwendung der autoMACS® Technologie isoliert, CFSE gefärbt und jeweils 2 x 10⁵ Zellen je 200 μ l IMDM-Komplettmedium pro Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. Eine Antigen-spezifische Stimulation erfolgte durch Zugabe von 1 μ g/ml

des Influenza immunogenen Peptids Haemagglutinin (HA)₁₁₀₋₁₂₀ und $2,5 \times 10^4$ per autoMACS® Technologie isolierte CD11c-positive DCs je Loch als Antigen-präsentierende Zellen für 48 Stunden bei 37°C. Die Proliferationsrate wurde über die Abnahme des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt.

2.10.4.6 Inhibitionstest

Zur Untersuchung der suppressiven Aktivität von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen und CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Nrp1-KO Mäusen *in vitro*, wurden diese Zellen mittels autoMACS® Technologie isoliert und mit 2×10^5 CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT Mäusen (*Responder*) im Verhältnis 1:1 in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 µl IMDM-Komplettmedium für 72 Stunden co-kultiviert. Zur Stimulation der Proliferation wurde anti-CD3-Antikörper mit einer Konzentration von 1 µg/ml (löslich) hinzugegeben. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes in den *Respondern* wurde durchflusszytometrisch bestimmt und diente als Maß für ihre Proliferation.

2.10.4.7 Bestimmung von intrazellulären Zytokinen

Für die durchflusszytometrische Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurden die entsprechenden Zellen in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 µl IMDM-Komplettmedium in Gegenwart von 5 µg/ml Brefeldin-A (BFA), mit 10 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin für 3 Stunden restimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und Oberflächenmoleküle gefärbt (s. Kapitel 2.10.4.1). Für die Färbung von intrazellulären Zytokinen wurden die Zellen nun mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 Minuten bei 4°C fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0,1 % NP40 in H₂O für 4 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit anti-IFN-γ- oder anti-IL-2-Antikörpern in FACS-Puffer für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln und die durchflusszytometrische Analyse.

2.10.5 Aktivierung von T-Zellen *in vitro*

Für die Ermittlung der differentiellen Genexpression, durchflusszytometrische Analysen von Aktivierungs-abhängigen Molekülen und für die Gewinnung von RNA zum Einsatz in der quantitativen RT Realtime-PCR, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

zunächst *in vitro* kultiviert und stimuliert. Hierfür wurden 1×10^6 mittels autoMACS® Technologie isolierte oder durchflusszytometrisch sortierte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in 1 ml IMDM-Komplettmedium pro Loch einer 24-Loch-Flachbodenplatte, die zuvor für 60 Minuten mit α -CD3-Antikörpern (*platebound*, 1 μ g/ml in PBS) inkubiert wurde, in Anwesenheit von 1 μ g/ml α -CD28-Antikörpern (löslich) für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.10.6 Bestimmung von sezernierten Zytokinen

Zur Bestimmung sekretierter Zytokine von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus CD4-Nrp1 und WT Mäusen, wurden die Zellkulturüberstände der Proliferationstest nach 72 Stunden abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung von IL-2, IFN- γ und IL-10 im Überstand erfolgte im Luminex200 unter Verwendung des „*Procarta Cytokine Assay Kits*“ (Panomics, Fremont, USA) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der Zytokine wurde mit der Luminex IS Software (Luminex Corporation, Austin, USA) bestimmt.

2.11 Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierexperimente und Eingriffe wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien und Bestimmungen der staatlichen Behörden und des Institutes durchgeführt.

2.11.1 Intravenöse Injektion von T-Zellen

Für den Transfer bestimmte $CD4^+CD25^-$ oder $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurden nach dem durchflusszytometrischen Sortieren in 150 μ l PBS aufgenommen und mittels einer Einmal-Feindosierungsspritze (0,3 x 12 mm, 0,1 – 1 ml, B. Braun Petzold GmbH) intravenös (i.v.) in die Schwanzvene der Mäuse injiziert.

2.11.2 INS-HA Modell

Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus CD4-Nrp1xTCR-HA und TCR-HA transgenen Mäusen in einem *in vivo* System, wurden diese zunächst durchflusszytometrisch sortiert. Anschließend wurden $2,5 \times 10^6$ der entsprechenden Zellen intravenös in INS-HA x Rag2-KO Mäuse injiziert, die das Influenza Hemagglutinin unter der Kontrolle des Ratten Insulinpromotors (INS-

HA) in den Langerhans-Inseln des Pankreas exprimieren und selbst keine reifen B und T-Zellen besitzen. Im Falle einer Infiltration von HA-spezifischen T-Zellen in den Pankreas kommt es zu einer Zerstörung der Langerhans-Inseln und somit der insulinproduzierenden Betazellen, was wiederum eine mangelnde Insulinproduktion und damit einen Anstieg des Blutzuckerspiegels nach sich zieht. Der Blutzuckerspiegel aller Versuchstiere wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Accu-chek® Blutzuckermessgerätes der Firma Roche und den dazugehörigen Teststreifen kontrolliert. Ein Glukosewert > 200 mg/dl Blut wurde als Maß für das Einsetzen einer Diabetes definiert (Sarukhan et al., 1998b). Erreichten ein oder mehrere Tiere diesen Wert, wurde der Versuch innerhalb von 24 Stunden beendet.

2.11.3 Tumortransplantation

5×10^5 MT/*ret* Melanomzellen, 5×10^6 VEGF^{+/+} oder VEGF^{-/-} embryonale Maus-fibroblasten oder 5×10^5 CT-26 Darmkrebszellen wurden in 100 µl PBS resuspendiert, mit 100 µl Matrigel versetzt und subcutan (s.c.) in die rechte Flanke 6-8 Wochen alter Mäuse injiziert. Das Tumorumfang wurde mit Hilfe einer digitalen Schieblehre an Tag 3/4, 7, 11 und 14 nach Transplantation ermittelt (Länge x Breite x Höhe in mm). Die Versuche wurden zu den angegebenen Zeitpunkten beendet. Tiere, deren Tumor vor Versuchsende eine Größe von 2 cm³ erreichte, wurden frühzeitig aus dem Versuch genommen. Im Fall des *Rescue*-Experiments erfolgte der adoptive Transfer von 8×10^5 WT Tregs unmittelbar vor der Transplantation der Tumorzellen.

2.12 Statistik

Alle angegebenen Statistiken wurden mit den angegebenen statistischen Tests und der Graph Pad Prism 5.0 Software (Graph Pad Software, La Jolla) analysiert (***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns (nicht signifikant) > 0,05).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung einer Neuropilin-1 transgenen Maus (CD4-Nrp1)

Murine natürliche $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen (Tregs), nicht aber $CD4^+CD25^-$ Effektor T-Zellen (Teffs) exprimieren auf ihrer Oberfläche Neuropilin-1 (Nrp1) (Bruder et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass $CD4^+Nrp1^+$ T-Zellen die Proliferation naiver $CD4^+$ T-Zellen inhibieren, und dass die Überexpression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 in naiven T-Zellen zur Expression von Nrp1 führt (Bruder et al., 2004; Loser et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass der im neuronalen System entdeckte Rezeptor Nrp1 an der Funktion von $CD4^+$ T-Zellen beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, wurde eine transgene Maus generiert (R. Naumann, Dresden), die die *nrp1* kodierende cDNA (Fujisawa et al., 1995) unter der Kontrolle des CD4 Promotors (mCD4E/p-sil Expressionsvektor, (Pauza et al., 2004)) spezifisch in T-Zellen exprimiert (Abb. 3.1).

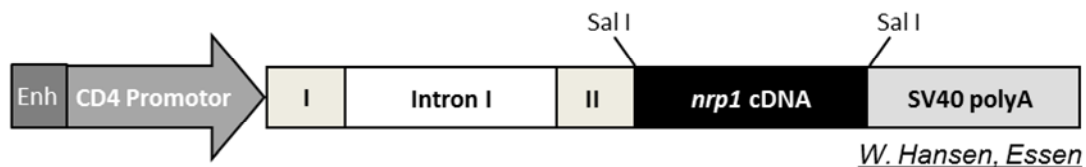


Abb. 3.1: mCD4E/p-sil Expressionsvektor mit *nrp1* cDNA. Der Vektor (M. Pauza) enthält neben der *nrp1* cDNA (H. Fujisawa) den murinen minimalen Enhancer (339 bp), den minimalen Promotor (489 bp), Exon I, einen Teil von Intron I und 32 bp von Exon II des *cd4* Gens und eine Polyadenylierungssequenz.

3.1.1 Neuropilin-1 Expressionsanalysen der CD4-Nrp1 transgenen Maus

Zunächst wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen (*fluorescence activated cell sorting* = FACS) die Expression von Nrp1 insbesondere auf den $CD4^+$ T-Zellen, aber auch auf den $CD8^+$ T-Zellen aus Blut, Milz, Thymus und Lymphknoten der CD4-Nrp1 Mäuse im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen ermittelt. Abbildung 3.2 A zeigt exemplarisch Aufnahmen von Milzzellen und das *Gating* auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie die Unterteilung der $CD4^+$ Population in CD25-positive und -negative Zellen. In Abbildung 3.2 B ist die Nrp1 Expression auf den unterschiedlichen T-Zellpopulationen ($CD4^+$, $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^-$, $CD8^+$) aus WT und CD4-Nrp1 Mäusen exemplarisch in Form von Histogrammen dargestellt. Die FACS-Analysen

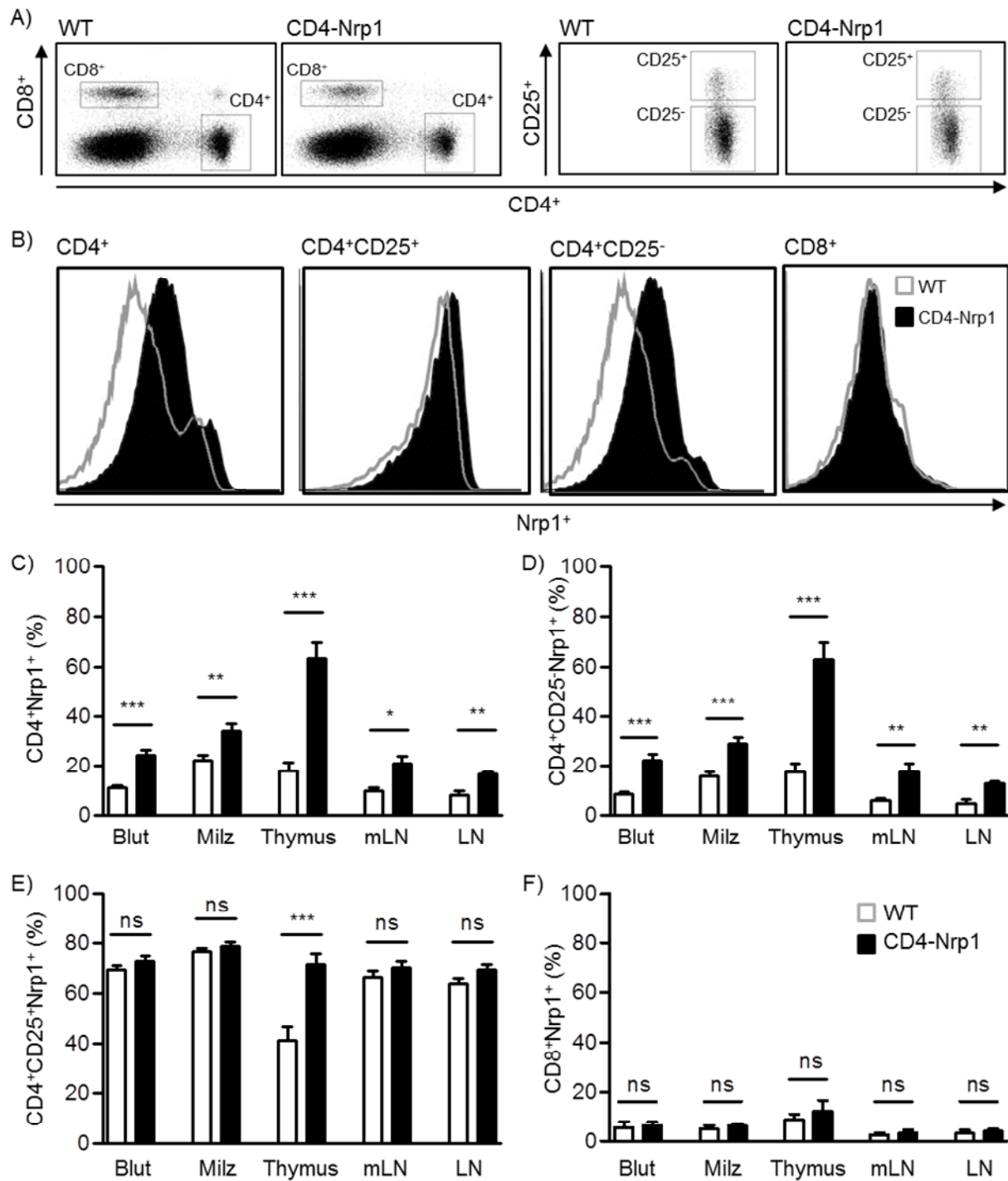


Abb. 3.2: Expressionsanalysen CD4-Nrp1 transgener Mäuse im Hinblick auf den Anteil an Nrp1-positiven T-Zellen. Zellen aus Blut und lymphatischen Organen Milz, Thymus, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und axillaren und inguinalen Lymphknoten (LN) von WT und CD4-Nrp1 Mäusen wurden gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Gating von WT Milzzellen auf CD4 und CD8 und Unterteilung der CD4⁺ T-Zellen in CD25-positive und -negative Zellen. (B) Direkter Vergleich der Nrp1 Expression in den unterschiedlichen T-Zellpopulationen. (C - E) Prozentualer Anteil Nrp1-positiver Zellen in der CD4⁺ T -Zellpopulation aus WT (n=9) und CD4-Nrp1 (n=10) Mäusen. (F) Prozentualer Anteil Nrp1-positiver Zellen in der CD8⁺ T-Zellpopulation aus WT und CD4-CD4-Nrp1 Mäusen (n=4). (Student's t-test *** p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05)

ergaben einen signifikant erhöhten prozentualen Anteil an Nrp1⁺ Zellen in der CD4⁺ Gesamtpopulation der CD4-Nrp1 Mäuse sowohl im Blut (24,3 % im Vergleich zu 11,2 % Nrp1⁺ Zellen im WT) als auch in den lymphoiden Organen (Abb. 3.2 C). Hier konnte der stärkste Anstieg von 18,0 % auf 63,3 % auf CD4⁺ Thymozyten beobachtet werden, aber auch in Milz und Lymphknoten der CD4-Nrp1 Tiere war der prozentuale Anteil an Nrp1-positiven CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp um das 1,5- bis 2-fache erhöht. Bei der weiteren Unterteilung der CD4⁺ T-Zellpopulation im Hinblick auf die CD25 Expression zeigte sich ein noch stärkerer Effekt in der CD4⁺CD25⁻ T-Zellpopulation mit bis zu 4-fach erhöhtem Anteil an CD4⁺CD25⁻Nrp1⁺ T-Zellen im Thymus und durchschnittlich 2,5-fach erhöhtem Anteil an CD4⁺CD25⁻ Nrp1⁺ T-Zellen im Blut und in anderen lymphoiden Organen CD4-Nrp1 transgener Mäuse (Abb. 3.2 D). Währenddessen konnte in der CD4⁺CD25⁺ Treg Population nur im Thymus ein erhöhter Anteil an CD4⁺CD25⁺Nrp1⁺ T-Zellen in CD4-Nrp1 Mäusen festgestellt werden, nicht aber in anderen lymphoiden Organen (Abb. 3.2 E). Hier ist zu beachten, dass bereits 75 – 80% der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in WT Mäusen Nrp1 exprimieren. Schließlich wurde noch die Expression von Nrp1 auf CD8⁺ T-Zellen aus den unterschiedlichen lymphoiden Organen bestimmt. Wie erwartet exprimierte nur ein sehr geringer Anteil der CD8⁺ T-Zellen in WT Mäusen Neuropilin-1 (3 – 9%), und auch in den CD4-Nrp1 transgenen Tieren konnte kein Anstieg in der Nrp1 Expression verzeichnet werden (Abb. 3.2 F). Lediglich in CD8⁺ T-Zellen des Thymus zeigte sich ein tendenziell leicht erhöhter Anteil an Nrp1-positiven Zellen in CD4-Nrp1 Mäusen im Vergleich zum WT, was aber durch die bekannte Aktivität des CD4 Promotors in CD8⁺ einfach-positiven T-Zellen des Thymus zu begründen ist (Ellmeier et al., 1999; Sawada and Littman, 1991; Siu et al., 1994). Neben dem Anteil an Nrp1-positiven Zellen wurde auch die durchschnittliche Expressionsstärke von Neuropilin-1 auf den unterschiedlichen Populationen von CD4⁺ T-Zellen gemessen. Abbildung 3.3 zeigt eine erhöhte Nrp1 Expression, sowohl auf der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen als auch auf der CD4⁺CD25⁻ Subpopulation.

Insgesamt zeigten die durchflusszytometrischen Analysen der Nrp1 Expression, dass es in der neu generierten transgenen CD4-Nrp1 Mauslinie zu einem spezifischen Anstieg der Nrp1 Expression im CD4⁺ T-Zellkompartiment kommt, wobei sich der Effekt sowohl des erhöhten prozentualen Anteils an Nrp1-positiven Zellen als auch der erhöhten durchschnittlichen Expressionsstärke am deutlichsten in den CD4⁺CD25⁻ T-Zellen darstellt.

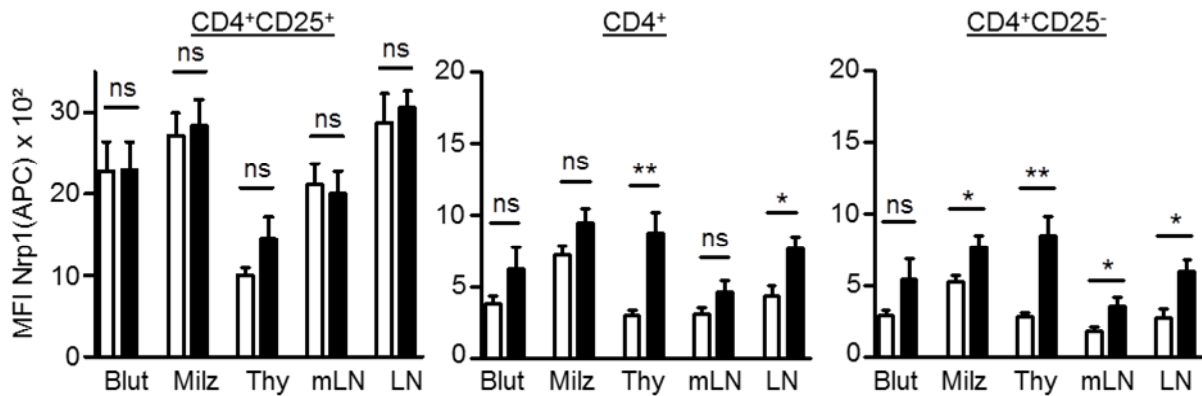


Abb. 3.3: Expressionsanalysen CD4-Nrp1 transgener Mäuse im Hinblick auf die Expressionsstärke von Nrp1. Zellen aus Blut und lymphatischen Organen Milz, Thymus, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und axillaren und inguinalen Lymphknoten (LN) von WT und CD4-Nrp1 Mäusen wurden gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensität des α -Nrp1-APC Antikörpers auf CD4⁺CD25⁺, CD4⁺ und CD4⁺CD25⁻ T Zellen aus WT (n=9) und CD4-Nrp1 (n=11) Mäusen. (Student's *t*-test *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns $p > 0,05$)

3.1.2 Einfluss der Neuropilin-1 Überexpression in CD4⁺ T-Zellen auf die Zusammensetzung der Lymphozyten

Um festzustellen, ob die transgene Überexpression von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen in CD4-Nrp1 transgenen Mäusen einen Einfluss auf die T-Zellentwicklung und auf die Anzahl an regulatorischen T-Zellen hat, wurde der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie der Anteil an CD4⁺Foxp3⁺ Tregs im Thymus und in den peripheren lymphatischen Organen der CD4-Nrp1 Mäuse durchflusszytometrisch untersucht und mit dem von WT Mäusen verglichen.

Wie in Abbildung 3.4 A und B dargestellt, weisen CD4-Nrp1 Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen keine Unterschiede in der Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf. Und auch der prozentuale Anteil an CD4⁺ T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren wird sowohl in CD25⁻ als auch in CD25⁺ T-Zellen nicht durch die Überexpression von Nrp1 beeinflusst (Abb. 3.4 D).

Somit hat die spezifische Überexpression von Neuropilin-1 in CD4-Nrp1 Mäusen keinen Einfluss auf die Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie auf den Anteil an regulatorischen T-Zellen im Thymus oder in der Peripherie.

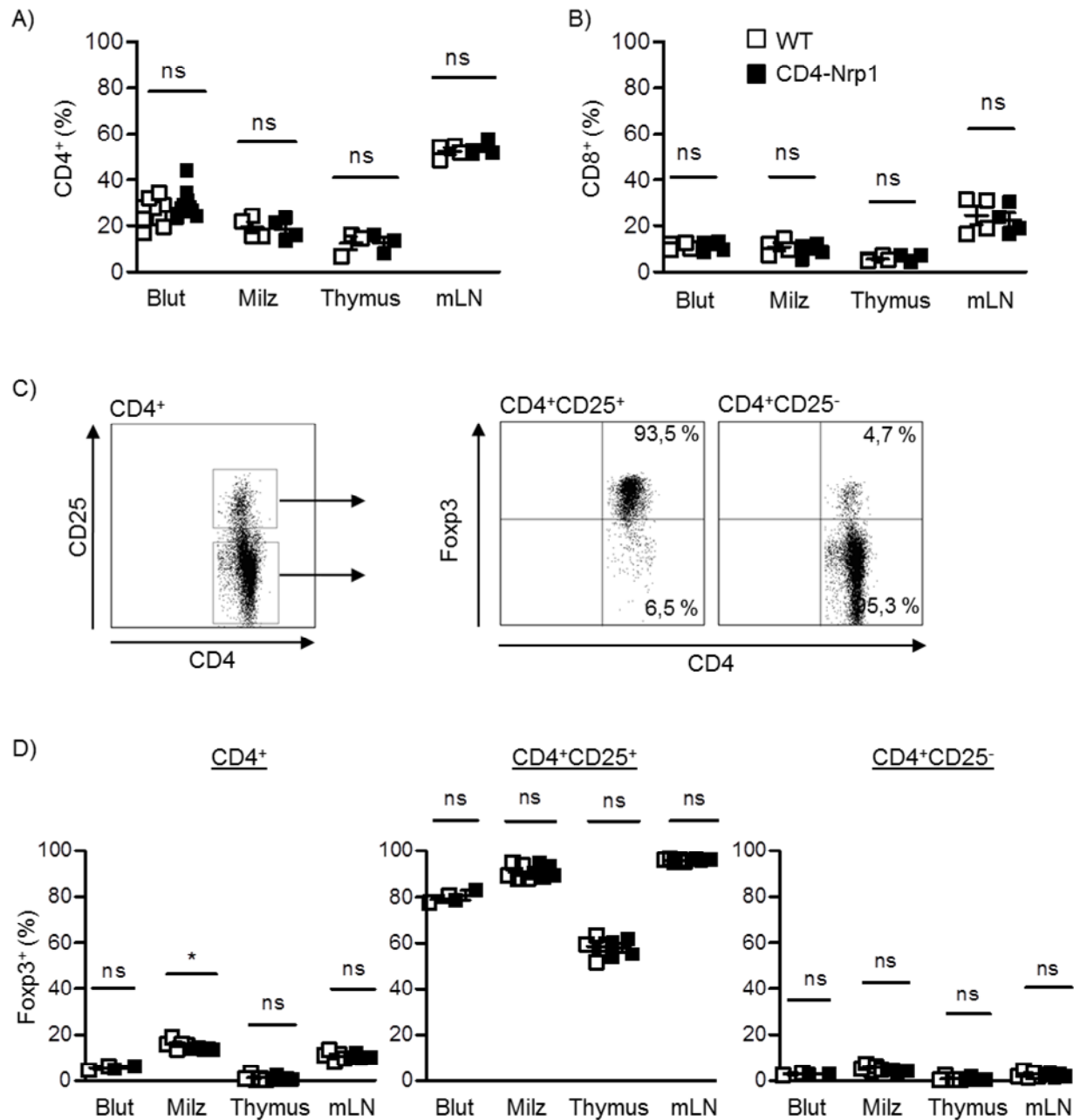


Abb. 3.4: Die Überexpression von Nrp1 in CD4-Nrp1 transgenen Mäusen hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation. (A,B) Durchflusszytometrische Analysen der Verteilung sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen im Blut und in den lymphatischen Organen in CD4-Nrp1 und WT Mäusen (n=4). (C) Exemplarische Darstellung des *Gatings* auf CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen für die Untersuchung der Foxp3 Expression. (D) Prozentualer Anteil an Foxp3⁺ in CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Blut und lymphatischen Organen aus WT und CD4-Nrp1 Mäusen (n=4). (*Student's t-test* *p < 0,05; ns p > 0,05)

3.1.3 Die Überexpression von Neuropilin-1 verändert das Genexpressionsprofil von stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Überexpression von Nrp1 auf den molekularen und funktionellen Phänotyp der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen selbst hat, wurden diese zunächst aus Milzen von CD4-Nrp1 transgenen und WT Tieren durchflusszytometrisch sortiert und im naiven Zustand oder aber nach 48-stündiger *in vitro* Aktivierung in Gegenwart von α -CD3 und α -CD28 für vergleichende Transkriptomanalysen mittels „*Agilent gene expression chip*“-Technologie (Dr. Robert Geffers, HZI Braunschweig) verwendet. So sollten Moleküle und Signalwege identifiziert werden, die möglicherweise durch die Expression von Nrp1 beeinflusst werden.

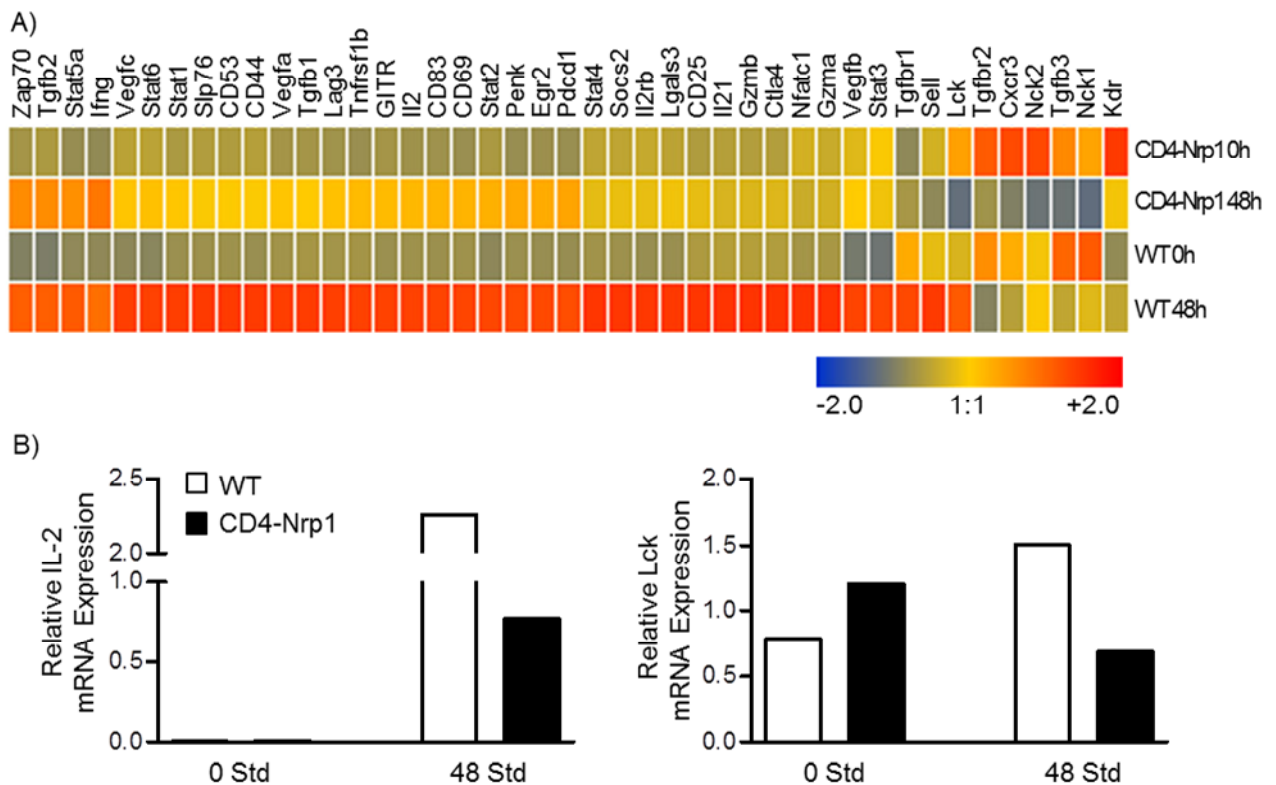


Abb. 3.5: Verändertes Genexpressionsprofil von CD4⁺CD25⁻ aus CD4-Nrp1 Mäusen nach Stimulation *in vitro*. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden aus Milzen von WT und CD4-Nrp1 Mäusen durchflusszytometrisch sortiert und 48 Std. in Gegenwart von α -CD3 und α -CD28 stimuliert. Das Genexpressionsprofil wurde mittels „*Agilent gene expression chip*“-Technologie analysiert und mit dem von unstimulierten Zellen verglichen. (A) Die *heat map* zeigt Gene mit mindestens 4-facher Regulation der Expression zwischen zwei der vier verglichenen Zellpopulationen, wobei rötliche Färbung eine verstärkte Expression bedeutet und bläuliche Färbung eine verringerte Expression. (B) Expression der Gene *il-2* und *lck* konnte mittels quantitativer Realtime PCR exemplarisch validiert werden.

Die in Abbildung 3.5 A dargestellte *heat map* zeigt eine Auswahl an Genen mit einer Signalintensität größer 20 und einer Regulation von mindestens 4-fachem

Unterschied in der Expression zwischen naiven oder aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus WT und $CD4-Nrp1$ Mäusen. Im Vergleich fiel auf, dass der größte Teil der Gene, welche in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus WT Mäusen nach *in vitro* Stimulation stärker exprimiert werden, in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus $CD4-Nrp1$ Mäusen nach Aktivierung nicht oder nur in geringerem Maße hochreguliert werden. So wird z.B. die mRNA für Oberflächenmoleküle wie die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), den frühen Aktivierungsmarker CD69, das Adhäsionsmolekül CD44, den B7-Rezeptor CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated 4*), Lag-3 (*lymphocyte activation gene 3*) und den TNF-Rezeptor GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related gene*), von denen

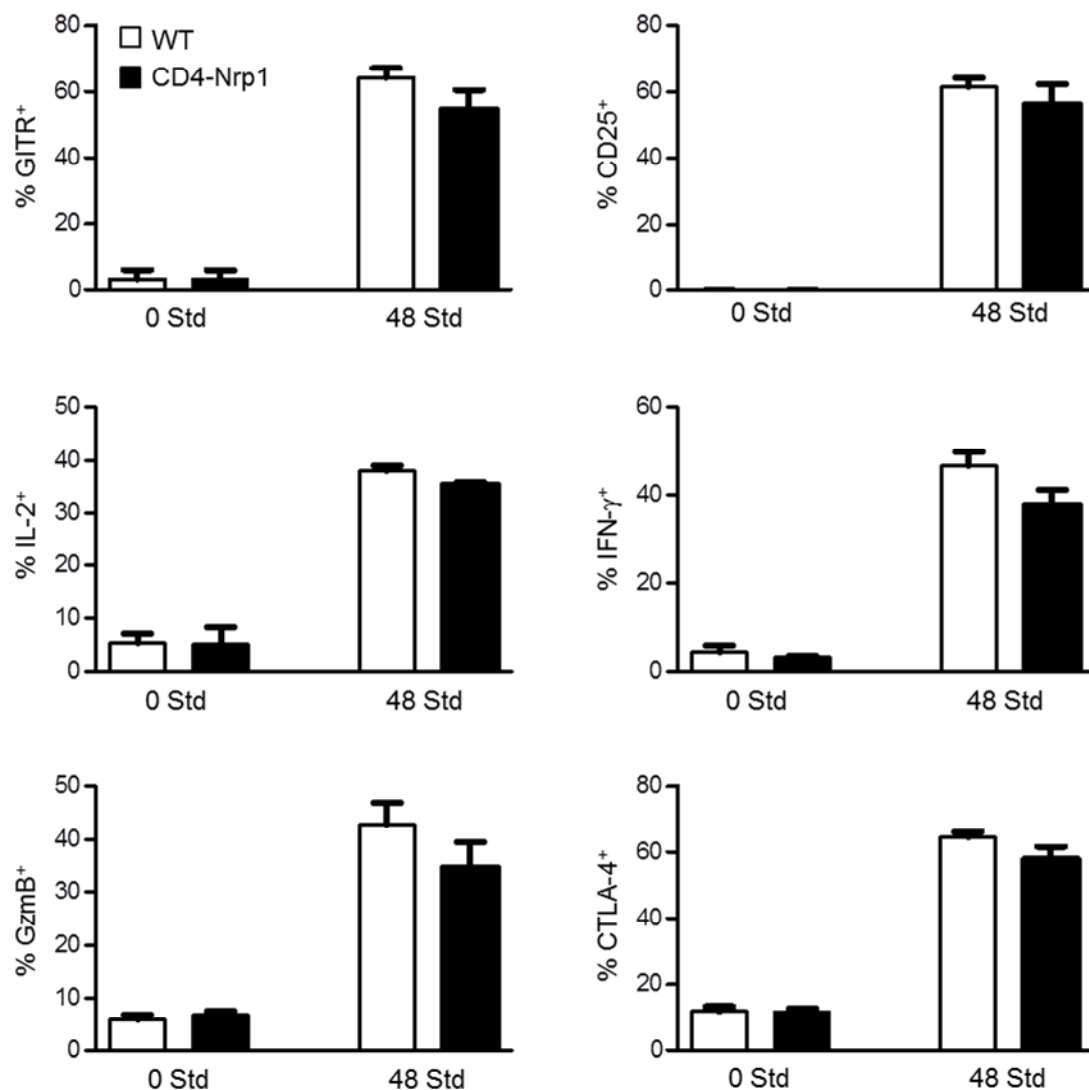


Abb. 3.6: $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus $CD4-Nrp1$ Mäuse zeigen nach Stimulation *in vitro* eine veränderte Expression von Aktivierungs-abhängigen Molekülen. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden aus Milzen von WT und $CD4-Nrp1$ Mäusen isoliert und 48 Std. in Gegenwart von α -CD3 und α -CD28 stimuliert. Die Expression von GITR, CD25, IL-2, IFN- γ , GzmB und CTLA-4 wurde vor und nach Stimulation durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus fünf (IFN- γ = 2) unabhängigen Experimenten.

bekannt ist, dass sie nach Stimulation des T-Zellrezeptors hochreguliert werden, in aktivierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen im Vergleich zum WT wesentlich moderater exprimiert. Ebenso Lck (*lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase*) und Slp76 (*SH2 domain-containing leukocyte protein, 76 kD*), zwei der drei Proteinkinasen, die am Anfang der Signalkaskade des T-Zellrezeptors stehen und das pro-inflammatorische Zytokin IL-2. Die verminderte Expression von IL-2 und Lck in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen nach Stimulation *in vitro* konnte mittels quantitativer Realtime PCR exemplarisch bestätigt werden (Abb. 3.5 B).

Des Weiteren zeigten FACS-Analysen von *in vitro* stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT und CD4-Nrp1 Mäusen, dass die Überexpression von Nrp1 auch auf Proteinebene Einfluss auf das Expressionsprofil der Zellen hat. So konnte sowohl für die intrazellulär gemessenen Zytokine IL-2 und IFN- γ und das Apoptose vermittelnde GzmB (Granzym B), als auch für Oberflächenrezeptoren wie GITR, CD25 und CTLA-4 ein tendenziell geringerer prozentualer Anteil an positiven Zellen nach Stimulation festgestellt werden (Abb. 3.6). Signifikante Unterschiede in den Expressionsmustern der Aktivierungs-abhängigen Moleküle konnten allerdings nicht detektiert werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Neuropilin-1 auf die Aktivierung von CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen Einfluss nehmen könnte.

3.1.4 Neuropilin-1 beeinflusst die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen *in vitro*, nicht aber ihre inhibitorischen Eigenschaften

Wie in 3.1.3 beschrieben, zeigen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen eine tendenziell veränderte Regulation von Genen, die im Zusammenhang mit der Aktivierung des T-Zellrezeptors oder damit verknüpfter Signalwege stehen. Dies ließ vermuten, dass die Expression von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen die T-Zellrezeptor-vermittelte Signaltransduktion beeinflussen könnte. Um den Einfluss der Nrp1 Expression auf die Funktion von CD4⁺ T-Zellen weitergehend zu analysieren, wurde als nächstes ihre proliferative Aktivität untersucht. Hierfür wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Milzen von WT und CD4-Nrp1 Mäusen mittels autoMACS® angereichert, mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) gefärbt und für 72 Stunden in Anwesenheit von α -CD3 kultiviert. Die Abnahme der Intensität des CFSE-Farbstoffes, der sich im Zytosol befindet und bei jeder Zellteilung in gleichen Mengen an die Tochterzellen weitergegeben wird, diente als Maß für die Proliferation. Wie in Abb.

3.7 A und B dargestellt, zeigen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus $CD4-Nrp1$ Mäusen im Vergleich zu Zellen aus WT Tieren eine tendenziell verminderte Proliferation.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass $CD4^+Nrp1^{high}$ T-Zellen, nicht aber

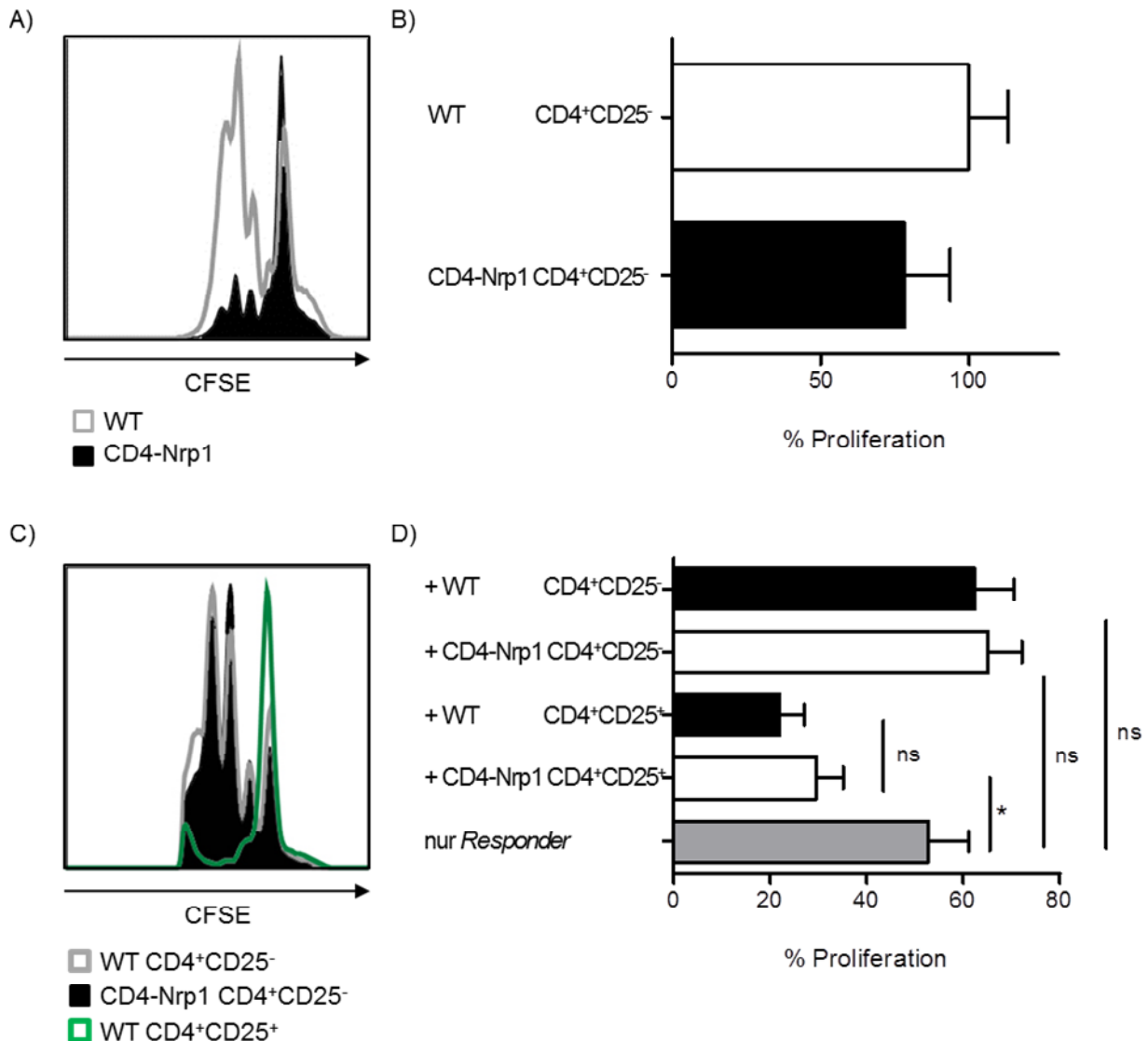


Abb. 3.7: $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus $CD4-Nrp1$ Mäusen zeigen *in vitro* reduzierte proliferative Aktivität, besitzen aber keine suppressiven Eigenschaften. 2×10^5 $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden aus WT oder $CD4-Nrp1$ Mäusen isoliert, CFSE-markiert und mit α -CD3 für 72 Stunden *in vitro* stimuliert. (A) Histogramm zur beispielhaften Darstellung des Unterschiedes im CFSE Signal zwischen WT (weiß) und $CD4-Nrp1$ (schwarz) T Zellen nach 72-stündiger Kultivierung. (B) Die Proliferation wurde anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt und auf die Proliferation der WT Zellen normalisiert. Daten aus vier unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. 2×10^5 $CD4^+CD25^+$ oder $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden aus WT und $CD4-Nrp1$ Mäusen isoliert und im Verhältnis 1:1 mit CFSE-markierten WT $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (*Responder*) in Anwesenheit von α -CD3 für 72 Stunden kultiviert. (C) Das Histogramm zeigt exemplarisch die Abnahme der Intensität des CFSE-Signals der *Responder* in Anwesenheit von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus WT (weiß) und aus $CD4-Nrp1$ (schwarz) Mäusen, und in Anwesenheit von WT $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (weiß mit grüner Begrenzung) (D) Daten aus sechs unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. (*Student's t-test* * $p < 0,05$; ns $p > 0,05$)

CD4⁺Nrp1^{low} T-Zellen aus WT Mäusen die Proliferation naiver CD4⁺CD25⁻ T-Zellen *in vitro* unterdrücken (Bruder et al., 2004). Daher stellte sich nun die Frage, ob die Überexpression von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen zur Induktion von suppressiven Eigenschaften führt. Um dies zu überprüfen, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 und WT Mäusen mittels autoMACS® sortiert und für 72 Stunden in Anwesenheit von α -CD3 im Verhältnis 1:1 mit CFSE-markierten naiven WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (*Responder*) co-kultiviert. Hierbei diente die Abnahme des CFSE Signals wieder als Maß für die Proliferation. Abb. 3.7 C und D zeigen, dass CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen die Proliferation von naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht beeinflussen. Während bei Zugabe von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sowohl aus WT als auch aus CD4-Nrp1 Mäusen die Proliferation der *Responder* signifikant supprimiert wird, kommt es bei Zugabe von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu einem Anstieg der proliferativen Aktivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression von Nrp1 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zwar ihre proliferative Aktivität *in vitro* modulieren kann, aber keine suppressiven Eigenschaften induziert.

3.1.5 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 transgenen Mäusen zeigen ein verändertes Zytokinprofil

Die Aktivierung von CD4⁺ Effektor T-Zellen im Immunsystem führt neben der Anregung ihrer Differenzierung und Vermehrung durch Proliferation auch zur Sekretion charakteristischer Zytokine. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob neben der Proliferation auch die Sekretion pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine durch die transgene Neuropilin-1 Expression in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen beeinflusst wird. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände der für den Proliferationstest kultivierten Zellen ebenfalls nach 72 Stunden entnommen und die sezernierten Zytokine mittels Luminex Technologie bestimmt (Abb. 3.8).

Die Analysen der Überstände zeigen, dass CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen bei *in vitro* Stimulation tendenziell geringere Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- γ (Abb. 3.8 A und B) sekretieren als Zellen aus WT Mäusen. Im Gegenzug kommt es aber zu einer tendenziell erhöhten Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus transgenen Mäusen (Abb. 3.8 C). Neben Genexpression und Proliferation scheint also auch die Sekretion von Zytokinen durch die Überexpression von Nrp1 beeinflusst zu werden.

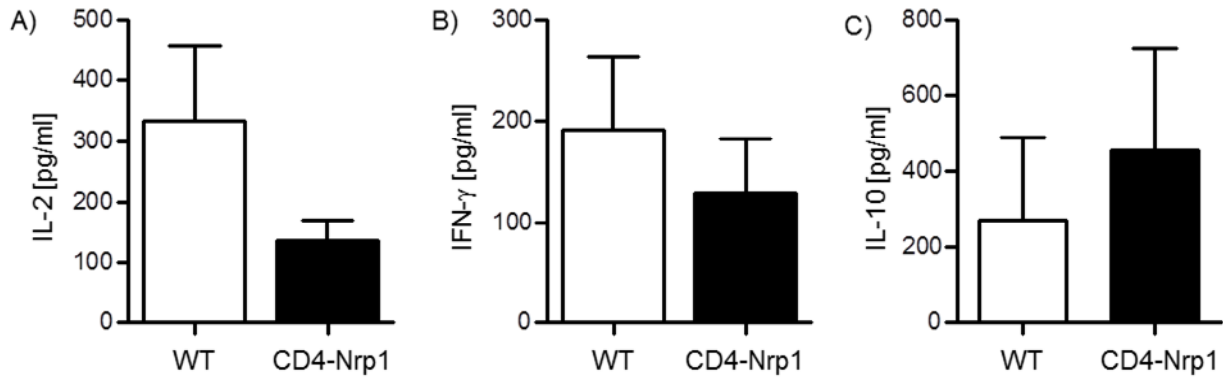


Abb. 3.8: Die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine nach *in vitro* Stimulation wird durch die Expression von Neuropilin-1 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen beeinflusst. 2×10^5 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT oder CD4-Nrp1 Mäusen wurden für 72 Stunden in Anwesenheit von α -CD3 kultiviert und die Zellkulturüberstände mittels Luminex Technologie analysiert (n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für die gemessene Konzentration an IL-2 (A), IFN- γ (B) und IL-10 (C).

3.1.6 Einfluss der Überexpression von Nrp1 auf die proliferative Aktivität von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Antigen-spezifischer Stimulation *in vitro*

Die bisher aufgezeigten Ergebnisse deuten auf eine Rolle von Neuropilin-1 in der Modulation der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen hin, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede im Verhalten von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT und CD4-Nrp1 Mäusen festgestellt werden. Da frühere Arbeiten gezeigt haben, dass Nrp1 an der Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen beteiligt ist (Sarris et al., 2008), sollte nun untersucht werden, ob die Überexpression von Nrp1 Einfluss auf das Verhalten von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen hat, wenn eine Stimulation *in vitro* über APCs (Antigen-präsentierende Zellen) erfolgt, die das spezifische Antigen präsentieren. Um dies zu analysieren, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mittels autoMACS® aus Milzen von CD4-Nrp1 Mäusen angereichert, die außerdem einen Klasse II MHC-bezogenen, HA-spezifischen T-Zellrezeptor exprimieren (CD4-Nrp1 x TCR-HA). Als Kontrolle dienten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus derselben Zucht, die Nrp1 nicht überexprimieren, aber den HA-spezifischen T-Zellrezeptor tragen (TCR-HA). Die Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für 48 Stunden in Anwesenheit des HA-Peptids und mittels autoMACS® angereicherter CD11c-positiver DCs als APCs kultiviert. Die Abnahme der Intensität des CFSE-Farbstoffes diente als Maß für die Proliferation. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, zeigen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 x TCR-HA Mäusen nach Antigen-spezifischer Stimulation ebenfalls tendenziell, aber nicht

signifikant verminderte proliferative Aktivität im Vergleich zu Zellen aus TCR-HA Mäusen.

Die Überexpression von Nrp1 in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen scheint also nicht nur in der polyklonalen, sondern auch in der Antigen-spezifischen Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen eine Rolle zu spielen.

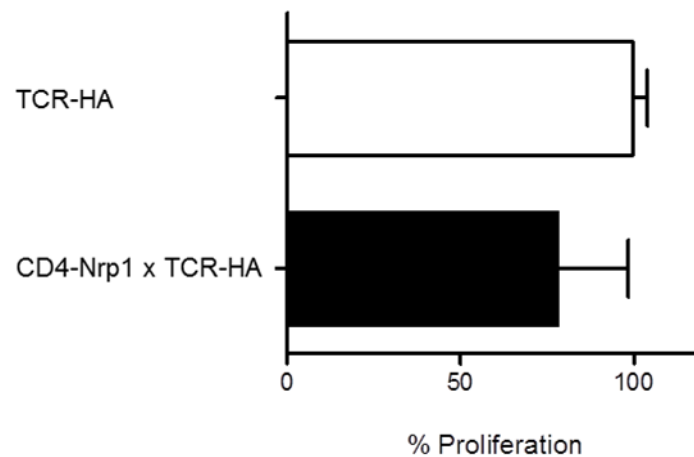


Abb. 3.9: $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus CD4-Nrp1 x TCR-HA Mäusen zeigen verminderte proliferative Aktivität nach Antigen-spezifischer Stimulation *in vitro*. 2×10^5 $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden aus TCR-HA oder CD4-Nrp1 x TCR-HA Mäusen isoliert, CFSE-markiert und in Anwesenheit des HA-Peptids und $CD11c^+$ DCs als antigenpräsentierende Zellen für 48 Stunden *in vitro* stimuliert. Die Proliferation wurde anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt und auf die Proliferation der WT Zellen normalisiert. Daten aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

3.1.7 Die Expression von Neuropilin-1 beeinflusst $CD4^+$ T-Zellen *in vivo*

In der Literatur ist beschrieben, dass der Transfer von TCR-HA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen in immundefiziente Rag2KO Mäuse, die weder T- noch B-Zellen entwickeln, und die darüber hinaus das Influenza Haemagglutinin unter der Kontrolle des Ratten Insulinpromotors exprimieren (INS-HA x Rag2KO) zur Entwicklung eines Diabetes führt (Sarukhan et al., 1998a). Die transferierten HA-spezifischen T-Zellen greifen dabei die HA-exprimierenden Betazellen des Pankreas an, was zu deren Schädigung, einer damit einhergehenden Störung der Insulinproduktion und letztendlich zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels führt. Somit stellt die INS-HA x Rag2KO Maus ein gutes Modell dar, um zu untersuchen inwieweit die Überexpression von Nrp1 auf $CD4^+$ T-Zellen deren Phänotyp auch in der wesentlich komplexeren *in vivo* Situation beeinflusst. Dazu wurden $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus CD4-Nrp1 transgenen Mäusen isoliert, die außerdem den HA-spezifischen T

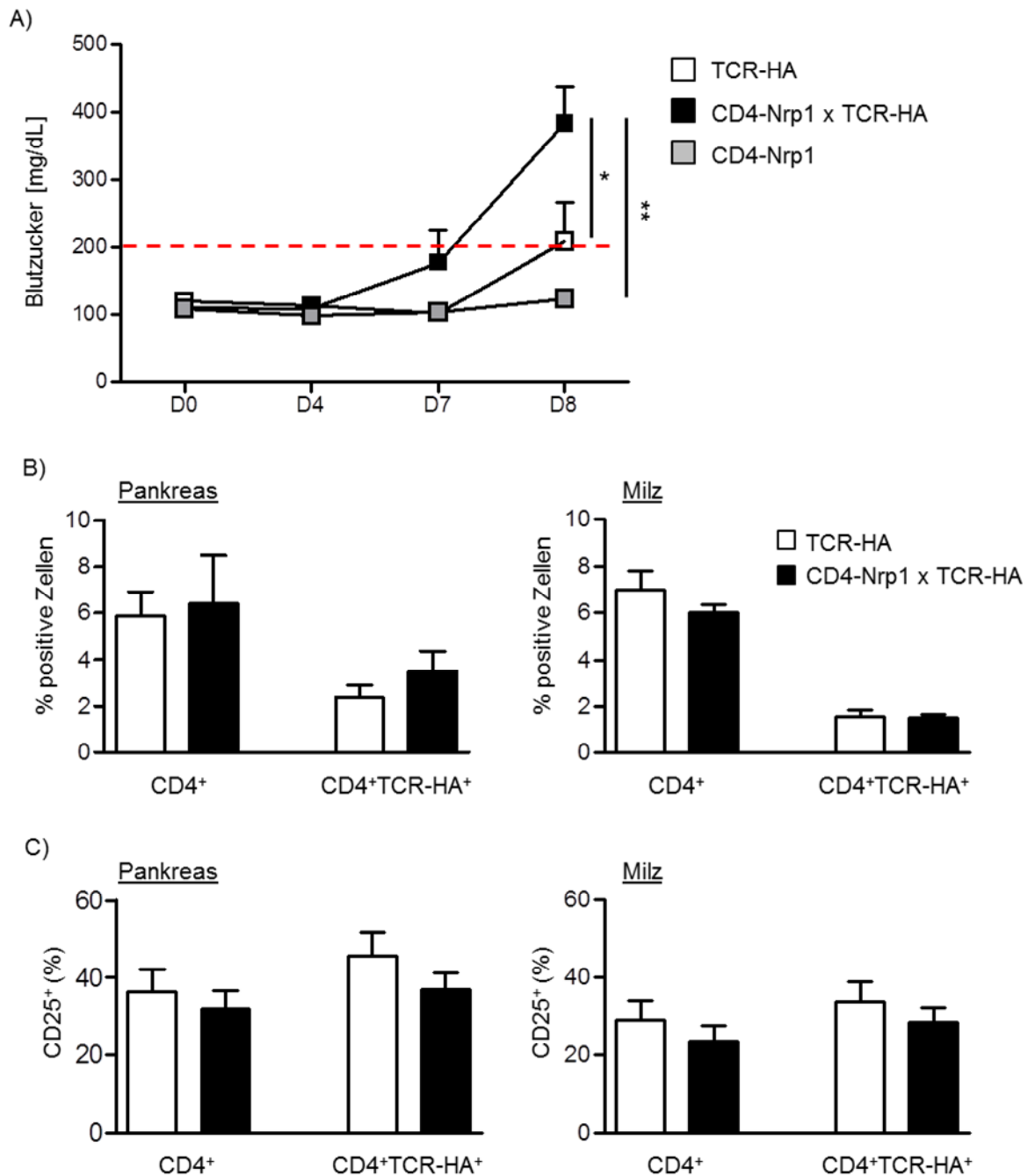


Abb. 3.10: Die Expression von Nrp1 auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, die den HA-spezifischen T - Zellrezeptor exprimieren, beschleunigt die Entstehung von Diabetes in INS-HA x Rag2KO transgenen Mäusen. 2,5 x 10⁶ CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden aus CD4-Nrp1, TCR-HA oder CD4-Nrp1 x TCR-HA transgenen Mäusen isoliert und in INS-HA x Rag2KO Mäuse transferiert. Als Maß für das Fortschreiten einer Infiltration der T-Zellen in den Pankreas und der einhergehenden Zerstörung der Betazellen wurde in regelmäßigen Abständen der Blutzuckerspiegel der Versuchstiere gemessen. Ein Wert > 200 mg/dL gilt als diabetisch. (A) Mittelwert mit Standardfehler der Blutzuckerwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. (B) Anteil an CD4⁺ und CD4⁺TCR-HA⁺ T-Zellen im Pankreas von Tieren, die TCR-HA oder CD4-Nrp1 x TCR-HA CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erhalten haben. (C) Expression von CD25 als Aktivierungsmarker auf CD4⁺ und CD4⁺TCR-HA⁺ T-Zellen im Pankreas. (n = 5-8) (*Student's t-test* ***p < 0,001; *p < 0,05; ns p > 0,05)

Zellrezeptor (CD4-Nrp1 x TCR-HA) exprimieren. Je $2,5 \times 10^6$ dieser Zellen wurden nun in INS-HA x Rag2KO Mäuse adoptiv transferiert. Als Kontrollen wurden außerdem CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 oder TCR-HA transgenen Mäusen verwendet. Durch die entzündliche Infiltration der HA-spezifischen T-Zellen in die HA-exprimierenden Langerhans-Inseln des Pankreas kommt es zur Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen in INS-HA x Rag2KO Mäusen, was wiederum zur Entwicklung von Diabetes führt. Dieser Vorgang spiegelt sich in einem Anstieg des Blutzuckerspiegels der Versuchstiere wider, der in regelmäßigen Abständen ermittelt wurde. Ein Anstieg des Blutzuckerwertes auf über 200 mg/dL gilt per Definition als diabetisch. Wie in Abbildung 3.10 A dargestellt, lässt sich ab Tag 7 nach Injektion der CD4-Nrp1 x TCR-HA CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ein Anstieg des Blutzuckerspiegels feststellen, nach Injektion von TCR-HA transgenen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen steigt der Blutzuckerspiegel erst ab Tag 8. Die Injektion von CD4-Nrp1 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zeigte, wie erwartet, keinen Effekt, da diese Zellen das HA-Antigen auf den Pankreaszellen nicht erkennen. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die Überexpression von Nrp1 tendenziell zu einem erhöhten Anteil an CD4⁺ T-Zellen, insbesondere an HA-positiven CD4⁺ T-Zellen im Pankreas führt, während in der Milz eher kein Unterschied im Anteil der HA-positiven CD4⁺ T-Zellen festzustellen ist (Abb. 3.10 B). Weitere FACS-Analysen zeigten aber auch, dass die injizierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, insbesondere auch hier die HA-positiven Zellen, aus CD4-Nrp1 x TCR-HA Mäusen zwar stärker infiltrieren, aber weiterhin in geringerem Maße aktiviert werden als Zellen aus TCR-HA Mäusen und somit CD25 weniger stark hochregulieren (Abb. 3.10 C).

Mit der Expression der *neuropilin-1* cDNA unter der Kontrolle des CD4 Promotors konnte eine transgene Mauslinie generiert werden, die Nrp1 spezifisch in CD4⁺ T-Zellen, insbesondere in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen überexprimiert, während andere Lymphozytenpopulationen nicht beeinflusst werden. Aus CD4-Nrp1 transgenen Mäusen isolierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zeigen nach Stimulation *in vitro* ein verändertes Genexpressionsprofil, tendenziell verminderte proliferative Aktivität *in vitro* und sezernieren geringere Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen. Im INS-HA x Rag2KO Modell zeigt sich eine erhöhte Anzahl an Antigen-spezifischen CD4-Nrp1 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen im Pankreas, die aber CD25, welches für ihre weitere Expansion und Differenzierung benötigt wird, in etwas geringerem Maße

hochregulieren als $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus TCR-HA Mäusen. Da auch die *in vitro* Daten eher gegen eine Expansion der Zellen durch Aktivierung und Proliferation sprechen, könnte dies auf eine Beteiligung von Nrp1 an weiteren Mechanismen, wie z.B. an der Einwanderung von $CD4^+$ T-Zellen in entzündliche Gewebe hinweisen.

3.2 Untersuchung der Auswirkungen der Deletion von Neuropilin-1 in $CD4^+$ T Zellen

Wie beschrieben, scheint die Überexpression von Nrp-1 in $CD4^+$ T-Zellen ihre Aktivierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* tendenziell, nicht aber signifikant zu beeinflussen, und auch keinerlei suppressive Eigenschaften hervorzurufen. Dies könnte aber auch damit zusammenhängen, dass nur ein Teil der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in den $CD4$ -Nrp1 transgenen Mäusen Nrp1 überexprimiert. Um weitere Hinweise auf Funktionen des neuronalen Rezeptors in $CD4^+$ T-Zellen zu erhalten, sollten deshalb nun die Auswirkungen der Deletion untersucht werden. Da die ubiquitäre Deletion von Neuropilin-1 letal ist (Jones et al., 2008; Kawasaki et al., 1999; Kitsukawa et al., 1997) wurde für weitere Untersuchungen eine konditionelle *Knockout* Maus verwendet (Nrp1-KO), in der die Nrp1 Expression spezifisch in den T-Zellen unterbunden wird. Dies wurde durch die Verpaarung von $Nrp1^{flox/flox}$ Mäusen (zur Verfügung gestellt von David. D. Ginty, Baltimore, USA) (Gu et al., 2003) mit $CD4$ -cre Mäusen (zur Verfügung gestellt von Werner Müller, Manchester, UK) erreicht.

3.2.1 Expression von Neuropilin-1 in $CD4$ -cre x $Nrp1^{flox/flox}$ Mäusen

Zunächst sollte mittels durchflusszytometrischer Analysen bestätigt werden, dass es in den verwendeten doppeltransgenen Mäusen tatsächlich zu einer spezifischen Deletion von Nrp1 in T-Zellen kommt. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Nrp-1 Expression in den $CD4^+$ T-Zellen von 19 % in der Milz ($p < 0,0001$) und 13 % in den mesenterialen Lymphknoten ($p < 0,0001$) auf unter 2 % in Nrp1-KO Mäusen (Abb. 3.11 A und B). Und auch im Blut konnte eine Reduktion der Nrp-1 Expression von 12 % ($p < 0,0006$) auf unter 2 % in Nrp1-KO Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.11 B). Hauptsächlich wirkt sich die Deletion von Nrp1 mittels $CD4$ -cre aber auf die $CD4^+CD25^+$ Treg Population aus (Abb. 3.11 A und C). Während über 80 % der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von WT Mäusen Nrp1 exprimieren,

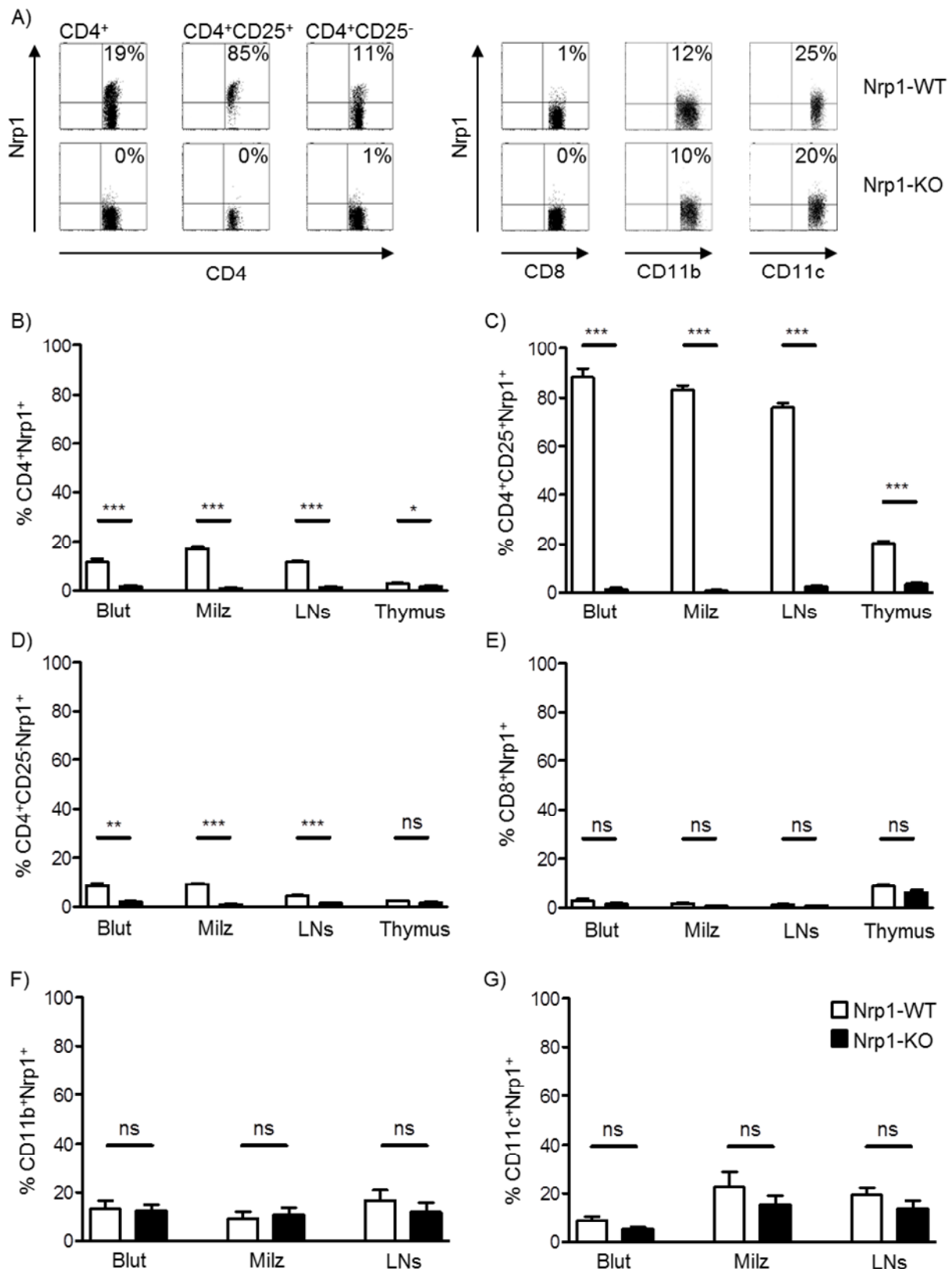


Abb. 3.11: In CD4cre x Nrp1^{flox/flox} Mäusen (Nrp1-KO) wird die Expression von Nrp1 spezifisch auf CD4⁺ T-Zellen, insbesondere auf CD4⁺CD25⁺ Tregs ausgeschaltet. Zellen aus Blut und lymphatischen Organen von Nrp1-KO und Nrp1-WT Tieren wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Dot plots zeigen exemplarisch die Expression von Nrp1 auf CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ und CD11c⁺ Zellen aus der Milz. (B - G) Mittelwerte mit Standardfehler der Nrp1 Expression auf Nrp1-WT und Nrp1-KO Lymphozyten. Daten sind zusammengefasst aus zwei unabhängigen Messungen. (Student's t-test *** p < 0,001; *p < 0,05; ns p > 0,05)

kann nur auf 1,5 % der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen der Milz und auf 3,5 % der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen der Lymphknoten von Nrp1-KO Mäusen die Expression von Nrp1 nachgewiesen werden ($p < 0,0001$, Abb. 3.11 A und C).

Weitergehende Analysen zeigten, dass neben den CD4⁺ T-Zellen weder CD8⁺ T-Zellen noch CD11c⁺ dendritische Zellen oder CD11b⁺ Makrophagen von der Nrp1 Deletion durch die T-Zell-abhängige Expression der Cre-Rekombinase betroffen sind (Abb. 3.11 A und E bis G). Es steht also für weitere Analysen eine Maus zur Verfügung, in der Nrp1 spezifisch auf CD4⁺ T-Zellen, insbesondere auf CD4⁺CD25⁺ Tregs ausgeschaltet wurde.

3.2.2 Einfluss der Deletion von Neuropilin-1 auf die Immunzellverteilung

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Deletion von Nrp-1 in CD4⁺ T-Zellen Einfluss auf die T-Zellentwicklung oder auf die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation hat. Hierfür wurden Blut, Milz, Thymus und mesenteriale Lymphknoten aus Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäusen entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. Wie in Abb. 3.12 A dargestellt, gibt es keine Unterschiede in der Expression von CD25 oder Foxp3 auf CD4⁺ T-Zellen aus Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäusen, was darauf schließen lässt, dass die Deletion von Nrp1 keinen Einfluss auf die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen hat. In den prozentualen Anteilen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation (Abb. 3.12 B & C) konnten leichte Schwankungen festgestellt werden (1-2 % Unterschied zwischen Nrp1-WT und Nrp1-KO CD4⁺ T-Zellen und 1-4 % Unterschied in der CD8⁺ Population), ebenso gibt es Schwankungen in der Menge an CD11c⁺ DCs, CD11b⁺ Makrophagen und F4/80⁺ Makrophagen in Milz und Lymphknoten (Abb. 3.12 D & E), die aber ebenfalls nur im Bereich von 1-2 % variieren. Somit hat die Deletion von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen keine Auswirkungen auf die Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen oder auf den Anteil an Dendritischen Zellen und Makrophagen.

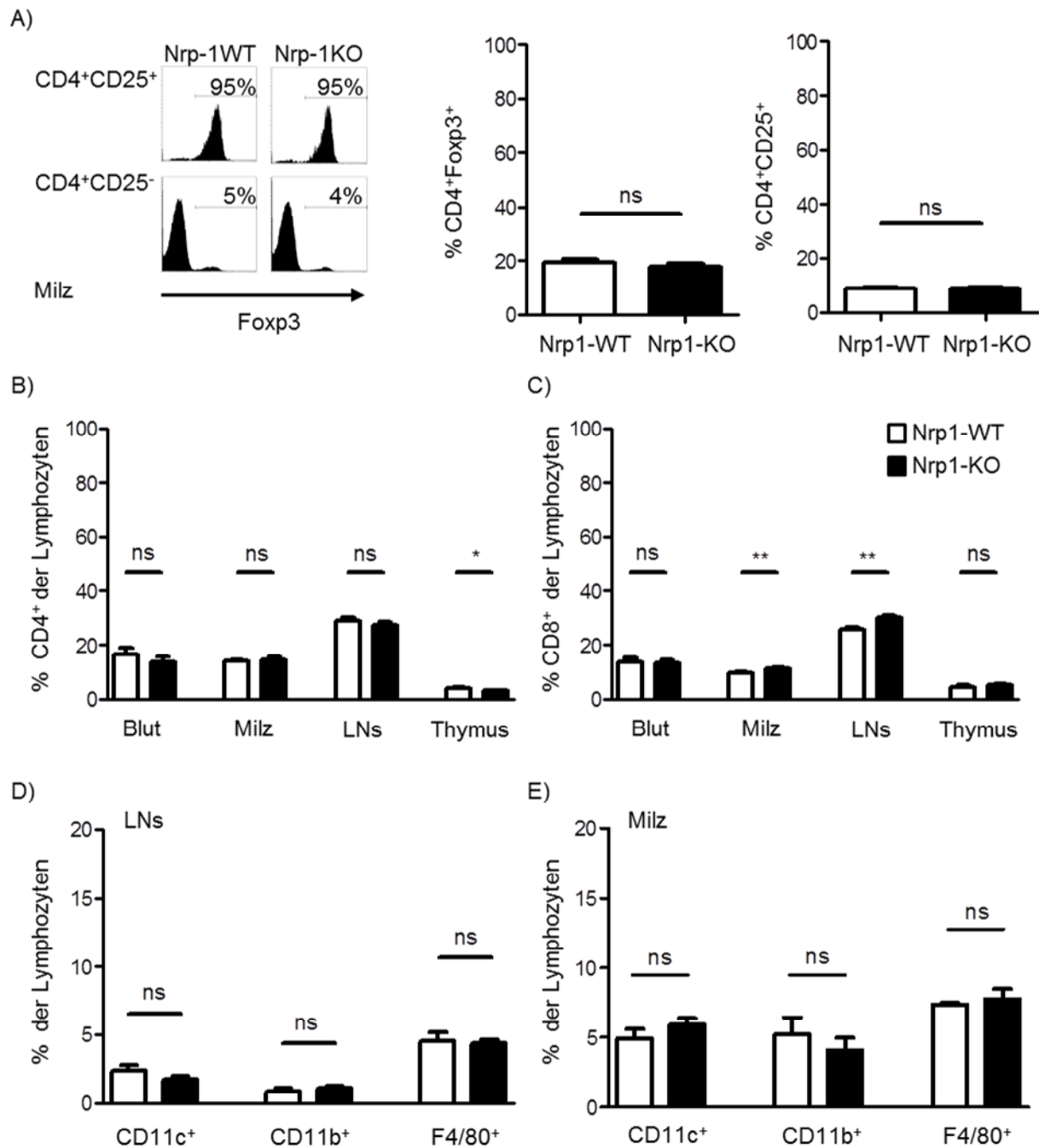


Abb. 3.12: Die Deletion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen hat keinen Einfluss auf ihre Entwicklung oder auf die Verteilung anderer Zellen des Immunsystems (A) Durchflusszytometrische Analysen der Expression von Foxp3 oder CD25 auf CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von Nrp1-WT (n = 8) und Nrp1-KO (n = 6) Mäusen. (B & C) Mittelwerte mit Standardfehler der prozentualen Anteile CD4- und CD8-positiver T-Zellen in der Lymphozytenpopulation in Blut (n = 3) und lymphatischen Organen Milz, Lymphknoten (LNs), Thymus (n = 8). (D & E) Mittelwerte mit Standardfehler der Anteile an CD11c⁺, CD11b⁺ und F4/80⁺ Zellen in Milz und Lymphknoten (n = 4). (*Student's t-test* **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05)

3.2.3 Neuropilin-1 wird *in vitro* nicht für die Treg-vermittelte Suppression benötigt

In Abschnitt 3.1.4 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Nrp1 in CD4-Nrp1 transgenen Mäusen den daraus isolierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen *in vitro* keine suppressiven Eigenschaften verleiht. Um nun zu überprüfen, ob die Deletion von Nrp1 zu einer Reduktion der suppressiven Eigenschaften von Tregs führt, wurden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus Nrp1-KO und Nrp1-WT Mäusen isoliert und für einen *in vitro* Inhibitionstest mit CFSE-markierten WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (*Responder*) im Verhältnis 1:1 in Anwesenheit von α -CD3 für 72 Stunden co-kultiviert. Als Maß für die Inhibition diente der Unterschied in der Abnahme des CFSE-Signals im Vergleich zu stimulierten *Respondern* alleine. Wie in Abb. 3.13 A & B dargestellt, zeigen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus Nrp1-KO und -WT Mäusen vergleichbare suppressive Aktivität, so dass davon auszugehen ist, dass weder die Deletion von Nrp1 in Tregs noch die Überexpression in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Abschnitt 3.1.4) Einfluss auf die suppressiven Eigenschaften dieser Zellen hat, während es durch die Überexpression, nicht aber durch die Deletion (Abb. 3.13 C) zu einer geringen Modulation der proliferativen Aktivität kommt. Es ist also anzunehmen, dass Nrp1 zwar eine mögliche Rolle in der Aktivierung von T-Zellen spielt, ihm aber noch weitere Aufgaben zukommen könnten. Hierauf weist auch die erhöhte Akkumulation der HA-spezifischen, Nrp1 transgenen CD4⁺ T-Zellen im Diabetesmodell hin (Abschnitt 3.1.7.).

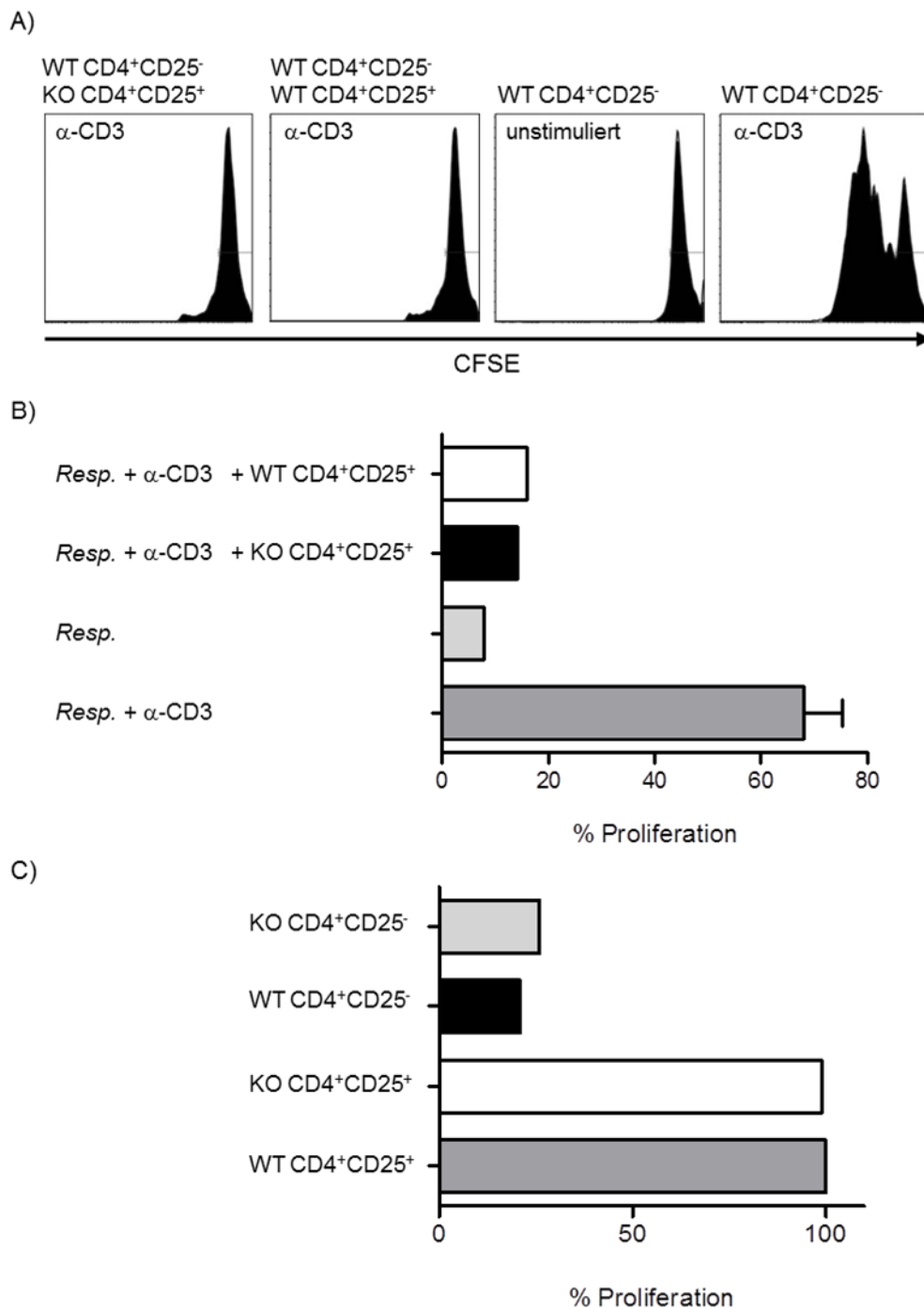


Abb. 3.13: Nrp1 defiziente CD4⁺CD25⁺ Tregs zeigen *in vitro* keine Veränderungen ihrer suppressiven oder proliferativen Eigenschaften. 2×10^5 CFSE-markierte WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (*Responder*) wurden für 72 Stunden in Anwesenheit von α-CD3 mit 2×10^5 Nrp1-KO oder Nrp1-WT CD4⁺CD25⁺ Tregs co-kultiviert. (A) Histogramme zeigen die Intensität des CFSE Farbstoffes innerhalb der CFSE-markierten *Responder*-Population. (B) Prozentualer Anteil an *Respondern*, die nicht mehr die maximale Fluoreszenzintensität besitzen. (C) Zur Ermittlung der proliferativen Aktivität wurden 2×10^5 Nrp1-WT oder Nrp1-KO CD4⁺CD25⁻ oder CD4⁺CD25⁺ T Zellen für 72 Stunden in Anwesenheit von α-CD3 kultiviert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität im Proliferations-test. Gezeigt wird ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Reduziertes Tumorwachstum in CD4-Nrp1KO Mäusen

Für Neuropilin-1 ist bekannt, dass es in unterschiedlichen Zellen eine Rolle bei der Migration spielt, so z.B. als Co-Rezeptor für VEGF in humanen Endothelzellen (Wang et al., 2003) und als Co-Rezeptor für Semaphorin-3A bei der Wanderung von Axonen im Laufe der neuronalen Entwicklung (He and Tessier-Lavigne, 1997). Erste Versuche mit einer Nrp1-überexprimierenden T-Zelllinie zeigen, dass Nrp1 auch an der Migration von T-Zellen in Richtung VEGF, zumindest *in vitro*, beteiligt ist (Hansen et al., 2012). Außerdem ist bekannt, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Tumoren spielen, indem sie die T-Zellantwort auf tumorspezifische Antigene unterdrücken. Sowohl in Krebspatienten, als auch in Tumor-tragenden Mäusen, konnte ein Anstieg an Tregs, insbesondere im Tumorgewebe nachgewiesen werden (North and Bursucker, 1984; Zou, 2006). Es wurde gezeigt, dass die Depletion regulatorischer T-Zellen mittels α -CD25 Antikörpern das Tumorwachstum verhindern kann (Onizuka et al., 1999). Auch die spezifische Depletion von Foxp3⁺ T-Zellen in der Maus führt zur Regression von B16 Melanomen, begleitet von einer erhöhten Anzahl intratumoraler, aktivierter CD8⁺ CTLs (Hansen et al., 2012; Klages et al., 2010).

Daraus ergibt sich die Hypothese, dass Nrp1 auf Tregs möglicherweise an der Infiltration dieser in VEGF-produzierendes Tumorgewebe und der lokalen Suppression der Immunantwort gegen den Tumor beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, wurde ein Modell ausgewählt, in dem MT/*ret* Melanomzellen in Verbindung mit extrazellulärer Matrix unter die Haut injiziert werden und lokal zur Entstehung eines Tumors führen (Nasarre et al., 2009). Die Tumorgröße wurde an Tag 4, 7, 11 und 14 p.i. (lat. *post injectionem*, nach einer Injektion) mittels digitaler Schieblehre (LxBxH in mm) bestimmt und ist in Abbildung 3.14 A dargestellt. Schon an Tag 7 p.i. zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Tumolvolumen der Nrp1-KO Mäuse (0,26 cm³) im Vergleich zum Wildtyp (0,37 cm³) und während die Tumore in Nrp1-WT Mäusen an Tag 14 p.i. ein Volumen von bis zu 2 cm³ erreichen, kann in Nrp1-KO Mäusen eine maximale Tumorgröße von 1 cm³ festgestellt werden (p = 0,0002). In Abbildung 3.14 B sind repräsentative Aufnahmen von Tieren 14 Tage nach Transplantation der MT/*ret* Zellen dargestellt, auf denen bereits der Unterschied in der Tumorgröße und der Beschaffenheit der Blutgefäße zu erkennen ist. Durchflusszytometrische Analysen ergaben keinen Unterschied in der Menge an CD8⁺ Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten der Tumore (Abb. 3.14 C),

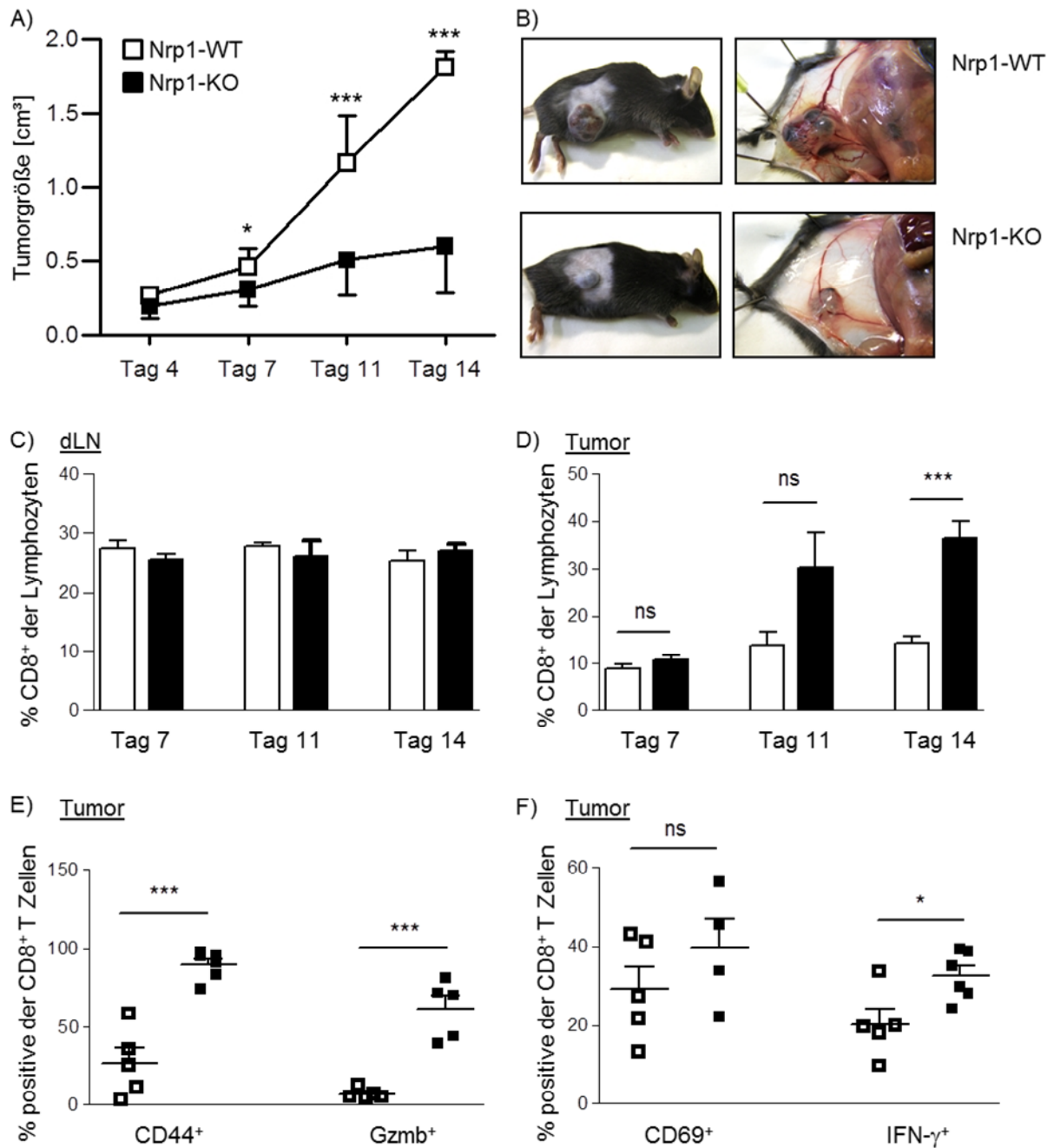


Abb. 3.14: Die spezifische Deletion von Neuropilin-1 in CD4⁺ T-Zellen verlangsamt das Tumorwachstum und führt zu einer verstärkten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen im Tumor. 5 x 10⁵ Zellen der etablierten MT/*ret* Tumorzelllinie wurden in Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäuse transplantiert und die Tumorgöße in regelmäßigen Abständen gemessen. 14 Tage nach Transplantation wurden Tumor und drainierender LN präpariert und im Hinblick auf die Population der CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. (A) Tumolvolumina an Tag 4, 7, 11 und 14 nach Transplantation zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Repräsentative Aufnahmen von Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäusen 14 Tage nach Transplantation der MT/*ret* Zellen. (C) Prozentualer Anteil an CD8⁺ Lymphozyten im drainierenden Lymphknoten an Tag 7, 11 und 14 nach Transplantation. (D) Anteil der CD8⁺ T-Zellen unter den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) an Tag 7, 11 und 14 nach Transplantation. (E & F) Expression von CD44, GzmB, CD69 und IFN- γ auf CD8⁺ T-Zellen im Tumor an Tag 14 nach Transplantation der MT/*ret* Zellen. (Student's *t*-test ***p=0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05) Daten veröffentlicht in: Hansen et al. 2012

aber einen prozentualen Anstieg der CD8⁺ T-Zellen in Tumoren der Nrp1-KO Mäuse an Tag 11 p.i. und eine signifikant erhöhte Anzahl der CD8⁺ T-Zellen an Tag 14 p.i. (Abb. 3.14 D). Die CD8⁺ T-Zellen aus Tumoren von Nrp1-KO Mäusen exprimieren außerdem verstärkt CD44 ($p = 0,001$), GzmB ($p = 0,002$), CD69 ($p = 0,2997$) und IFN- γ ($p = 0,02$), sind also stärker aktiviert als CD8⁺ T-Zellen aus Tumoren von WT Tieren (Abb. 3.14 E & F). Da die Deletion von Nrp1 in den Tregs der Nrp1-KO Mäuse nicht zu einer Reduktion ihrer suppressiven Aktivität führt (Abschnitt 3.2.3), müssen weitere Mechanismen betroffen sein, die die Rekrutierung und Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen begünstigen. Anhand von Cryoschnitten der Tumore konnte gezeigt werden, dass es bereits früh in der Tumorentwicklung zu einer Störung der Infiltration von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen in den Tumor kommt (zur Verfügung gestellt von Dr. Iris Helfrich, Essen). Während Nrp1-WT Mäuse eine homogene Verteilung der Tregs im Tumorgewebe aufweisen, beschränkt sich die Lokalisation der Foxp3⁺ T-Zellen in Tumoren der Nrp1-KO Mäuse auf den äußeren Tumorrand, was auf eine Störung der Infiltration durch die Deletion von Nrp1 hinweist (Abb. 3.15).

Durch die spezifische Deletion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen kann also eine verbesserte anti-Tumor Immunantwort erreicht werden, die sich durch eine erhöhte Anzahl von aktivierten CD8⁺ T-Zellen und eine verminderte Anzahl von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe auszeichnet.

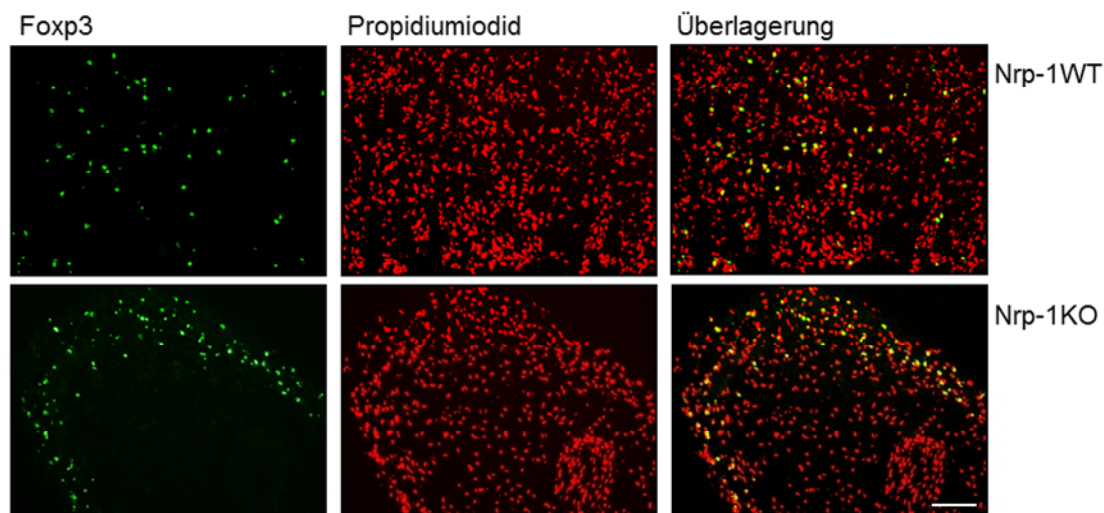


Abb. 3.15: Die Infiltration von Foxp3⁺ T-Zellen in den Tumor wird durch die spezifische Deletion von Neuropilin-1 in CD4⁺ T-Zellen gestört. 5×10^5 Zellen der etablierten MT/*ret* Tumorzelllinie wurden in Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäuse transplantiert, nach 24 Stunden präpariert und mikroskopisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder (zur Verfügung gestellt von Dr. Iris Helfrich, Essen) der Foxp3⁺ Treg Infiltration in Tumore von Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäuse 24 h nach Transplantation der MT/*ret* Zellen. Foxp3-Färbung in grün, Gegenfärbung der Nuclei mit Propidiumiodid (rot). Maßstab: 100 μ m. Daten veröffentlicht in: Hansen et al. 2012

3.2.5 Nrp-1⁺ Tregs benötigen VEGF um in den Tumor zu infiltrieren

In Abschnitt 3.2.4 konnte gezeigt werden, dass weniger regulatorische T-Zellen im Tumorgewebe zu finden sind, wenn die Expression von endogenem Nrp1 auf T-Zellen ausgeschaltet wird. Um zu untersuchen, ob für die erhöhte Treg-Infiltration in Tumore neben Treg-exprimiertem Nrp1 auch vom Tumor produziertes VEGF verantwortlich ist, wurden 5×10^6 VEGF-defiziente (VEGF^{-/-}) Mausfibroblasten (Stockmann et al., 2008) zusammen mit extrazellulärer Matrix subkutan in Nrp1-KO und -WT Mäuse injiziert und die Tumorgroße mittels digitaler Schieblehre an Tag 3, 7 und 11

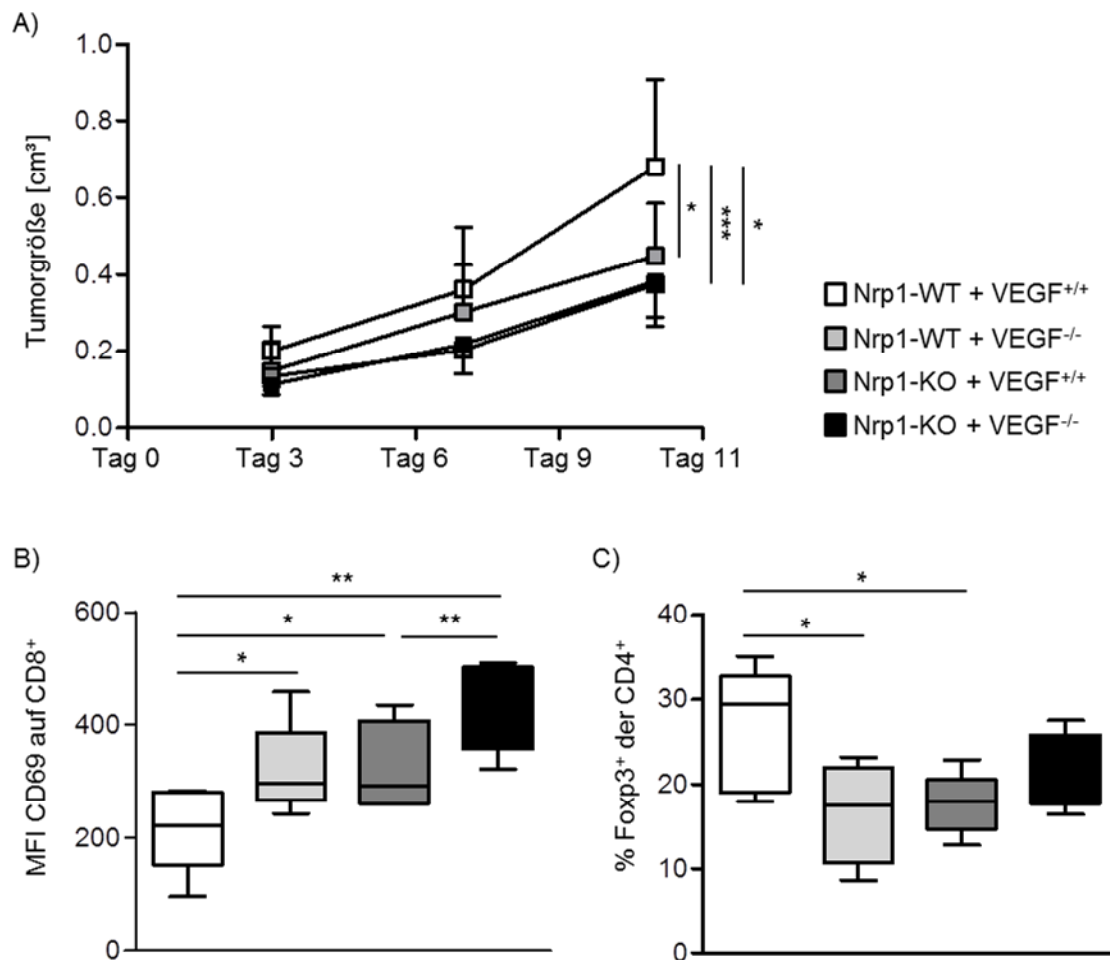


Abb. 3.16: Tumorzell-sekretiertes VEGF wird für die Migration von Tregs in den Tumor benötigt. 5×10^6 VEGF^{+/+} oder VEGF^{-/-} Fibroblasten wurden in Nrp1-WT oder Nrp1-KO Mäuse transplantiert und das Tumorwachstum an Tag 3, 7 und 11 gemessen. (A) Mittelwerte mit Standardfehler der Tumervolumina in cm³ zusammengefasst aus fünf unabhängigen Experimenten. (B) CD69 Expression auf CD8⁺ T-Zellen des Tumors an Tag 11; Mittelwerte mit Standardfehler zusammengefasst aus 3 unabhängigen Experimenten. (C) Prozentualer Anteil an Foxp3-positiven CD4⁺ T-Zellen im Tumorgewebe wurde an Tag 11 nach Transplantation durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler zusammengefasst aus 2 unabhängigen Experimenten. (Student's *t*-test ***p=0,001; **p < 0,01; *p < 0,05) Daten veröffentlicht in: Hansen et al. 2012

und 11 ermittelt (LxBxH in mm). Als Kontrolle dienten die entsprechenden VEGF-exprimierenden Fibroblasten (VEGF^{+/+}). Abbildung 3.16 A zeigt, dass es sowohl in Nrp1-KO Mäusen, die VEGF^{+/+} Fibroblasten erhielten, als auch in Nrp1-WT Mäusen, die VEGF^{-/-} Zellen erhielten, zu verlangsamtem Tumorwachstum im Vergleich zu Nrp1-WT Tieren kommt, die VEGF^{+/+} Fibroblasten erhielten, während die Transplantation von VEGF^{-/-} Zellen in Nrp1-KO Mäuse keinen additiven Effekt hatte. Auch in diesem Modell des Fibrosarkoms in der Maus scheint es zu einer verstärkten Aktivierung der intratumoralen CD8⁺ T-Zellen in Nrp1-KO Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp Kontrollen zu kommen (Abb. 3.16 B), was wiederum durch die Hinderung der regulatorischen T-Zellen verursacht werden könnte, in den Tumor zu migrieren, um dort die lokale anti-Tumor Immunantwort zu unterdrücken. Weitergehende durchflusszytometrische Analysen des Tumorgewebes zeigten, dass der prozentuale Anteil an Foxp3-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen in Nrp1-WT Mäusen die VEGF^{+/+} Fibroblasten erhielten, signifikant höher ist als in Nrp1-WT Mäusen die VEGF^{-/-} Zellen erhalten haben oder in Nrp1-KO Mäusen, denen VEGF^{+/+} Fibroblasten injiziert wurden (Abb. 3.16 C). Das Ausschalten der endogenen Nrp1-Expression auf CD4⁺ T-Zellen oder die Deletion von VEGF auf Tumorzellen resultieren demnach im gleichen Phänotyp. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Foxp3⁺ Tregs in Abhängigkeit von Tumor-sekretiertem VEGF in den Tumor infiltrieren, und dass Neuropilin-1 in diesem Prozess eine wichtige Rolle spielt.

3.2.6 Die spezifische Deletion von Nrp1 auf regulatorischen T-Zellen führt zu reduziertem Tumorwachstum

Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, exprimieren nicht nur CD4⁺CD25⁺ T-Zellen Nrp1, sondern auch ein geringer Anteil der CD25-negativen CD4⁺ T-Zellen (2 bis 10 % in WT Mäusen). Da die Deletion von Nrp1 in CD4-cre x Nrp1^{flox/flox} Mäusen nicht nur Tregs, sondern auch die Population der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen betrifft, sollte verifiziert werden, inwieweit die Unterschiede in der Nrp1 Expression auf CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen (Abb. 3.11 D) an dem Phänotyp des reduzierten Tumorwachstums in Nrp1-KO Mäusen beteiligt sind. Deshalb wurden nun Mäuse verwendet, die eine "IRES-Cre"-Sequenz (*internal ribosome entry site*, IRES) unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors exprimieren (Fox-IRES-Cre, FIC). Diese wurden mit den Nrp1^{flox/flox} Mäusen verpaart, was zur spezifischen Deletion von Neuropilin-1 in allen Foxp3-positiven regulatorischen T-Zellen führt (FIC-Nrp1-KO), wobei die CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻

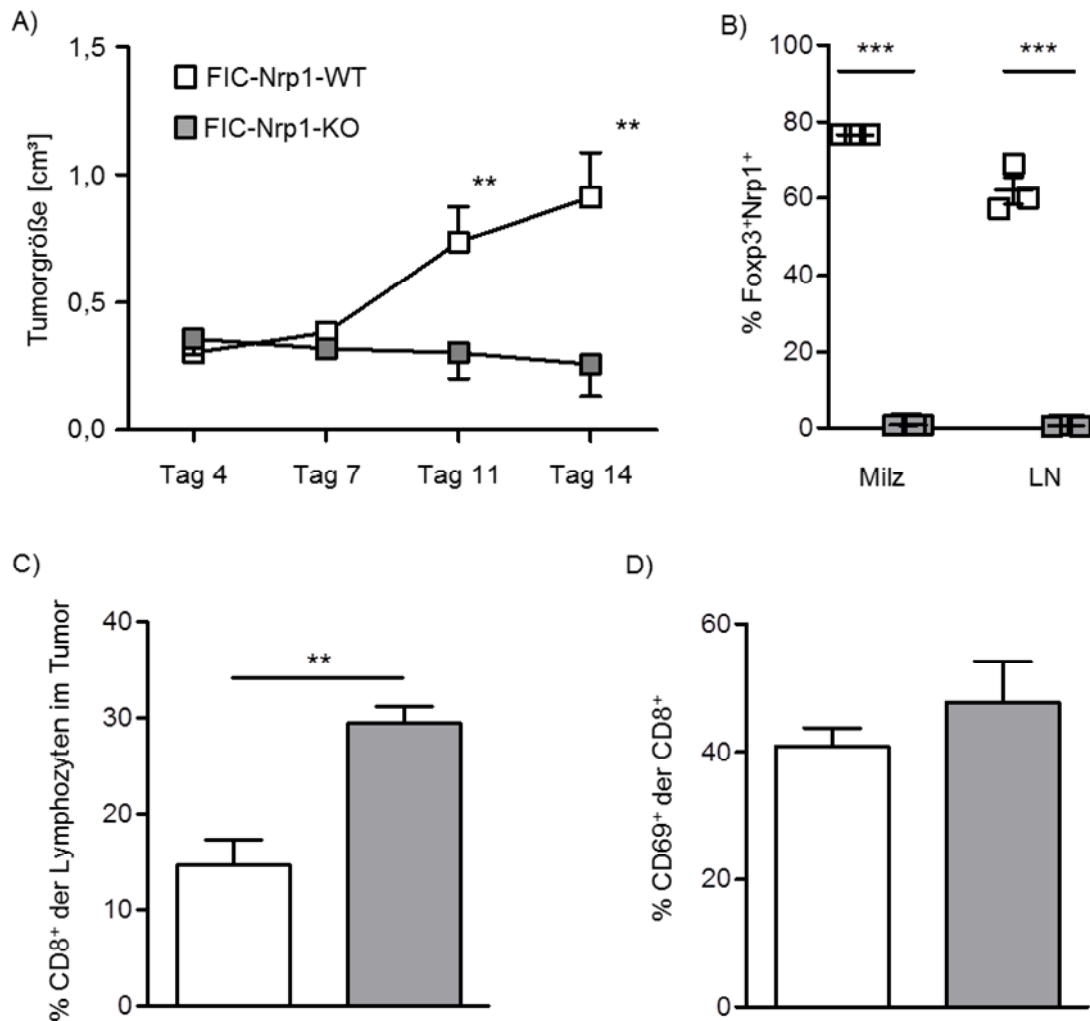


Abb. 3.17: Die Treg-spezifische Deletion von Nrp1 in FIC-Nrp1-KO Mäusen führt zu verlangsamttem Tumorwachstum einhergehend mit der erhöhten Anzahl und Aktivierung von intratumoralen CD8⁺ T-Zellen. 5 x 10⁵ CT-26 Tumorzellen wurden subkutan injiziert und das Tumolvolumen gemessen. (A) Tumolvolumina von FIC-Nrp1-WT und FIC-Nrp1-KO Mäusen an Tag 4, 7, 11 und 14 p.i. (B) Nrp1 Expression auf Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten (LN) der Versuchstiere an Tag 14. (C) Prozentualer Anteil der CD8⁺ T-Zellen in der Lymphozytenpopulation im Tumor und der darin enthaltene Anteil an CD69-positiven Zellen (D) an Tag 14 pi. Mittelwerte mit Standardfehler sind zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten. (*Student's t-test* ***p=0,001; **p < 0,01) Daten (A – C) veröffentlicht in: Hansen et al. 2012

T-Zellen nicht betroffen sind. 5 x 10⁵ Zellen der Darmkrebs Zelllinie CT-26 (engl. *colonic tumor 26*) wurden nun zusammen mit extrazellulärer Matrix subkutan injiziert und das Tumolvolumen an Tag 4, 7, 11 und 14 p.i. mittels digitaler Schieblehre ermittelt (LxBxH in mm). Wie in Abbildung 3.17 A dargestellt, führt auch die Treg-spezifische Deletion von Nrp1 zu einer signifikanten Reduktion des Tumorstwachstums. Bei der Überprüfung der Nrp1 Expression auf Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen konnte eine signifikante Reduktion von 77 % auf unter 1 % Nrp1-positive Zellen in der Milz und von 62 % auf unter 1 % Nrp1-positive Zellen in Lymphknoten festgestellt

werden (Abb. 3.17 B). Analog zu den Ergebnissen der MT/*ret* Tumore findet sich auch in den CT-26 Tumoren der FIC-Nrp1-KO Mäuse ein erhöhter prozentualer Anteil an CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.17 C) die ebenfalls mehr CD69 exprimieren als CD8⁺ T-Zellen aus Tumoren von FIC-Nrp1-WT Tieren (Abb. 3.17 D). Diese Ergebnisse zeigen, dass insbesondere die Expression von Neuropilin-1 auf regulatorischen Foxp3⁺ T-Zellen, nicht aber auf CD4⁺Foxp3⁻ Effektor T-Zellen für den Phänotyp des reduzierten Tumorwachstums in Nrp1-KO Mäusen verantwortlich ist.

3.2.7 Der adoptive Transfer von WT Tregs hebt den Phänotyp des verlangsamten Tumorwachstums in Nrp1-KO Mäusen auf

Sowohl in CD4-Nrp1-KO Mäusen als auch in FIC-Nrp1-KO Mäusen kommt es zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums aufgrund der Deletion von Nrp1 auf T-Zellen, insbesondere auf CD4⁺ Tregs. Um diese Beobachtung, dass Nrp1 für die Infiltration von Foxp3⁺ Tregs in den Tumor benötigt wird, zu bekräftigen, wurden ein weiteres Mal MT/*ret* Melanomzellen zusammen mit extrazellulärer Matrix in Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäuse injiziert. Eine Gruppe von Nrp1-KO Mäusen erhielt außerdem i.v. (intravenös) 8 x 10⁵ sortierte CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus WT Mäusen. Wie in den vorhergehenden Experimenten konnte in Nrp1-KO Mäusen ein verlangsamtes Tumorwachstum im Vergleich zu Nrp1-WT Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.18 A). Im Gegensatz dazu entwickeln Nrp1-KO Tiere, die WT CD4⁺CD25⁺ T-Zellen erhalten haben, signifikant größere Tumore als unbehandelte Nrp1-KO Tiere und zeigen Tumorumfänge, die mit denen von Nrp1-WT Tieren vergleichbar sind.

Des Weiteren ergaben durchflusszytometrische Analysen der Tumore eine tendenzielle Reduktion des Anteils der CD8⁺ T-Zellen in Tumoren behandelter im Vergleich zu unbehandelten Nrp1-KO Mäusen (Abb. 3.18 B). Aufgrund dieser Resultate ist davon auszugehen, dass Nrp1 auf Tregs für die Infiltration in Tumorgewebe benötigt wird, wo diese eine effiziente Immunantwort unterdrücken.

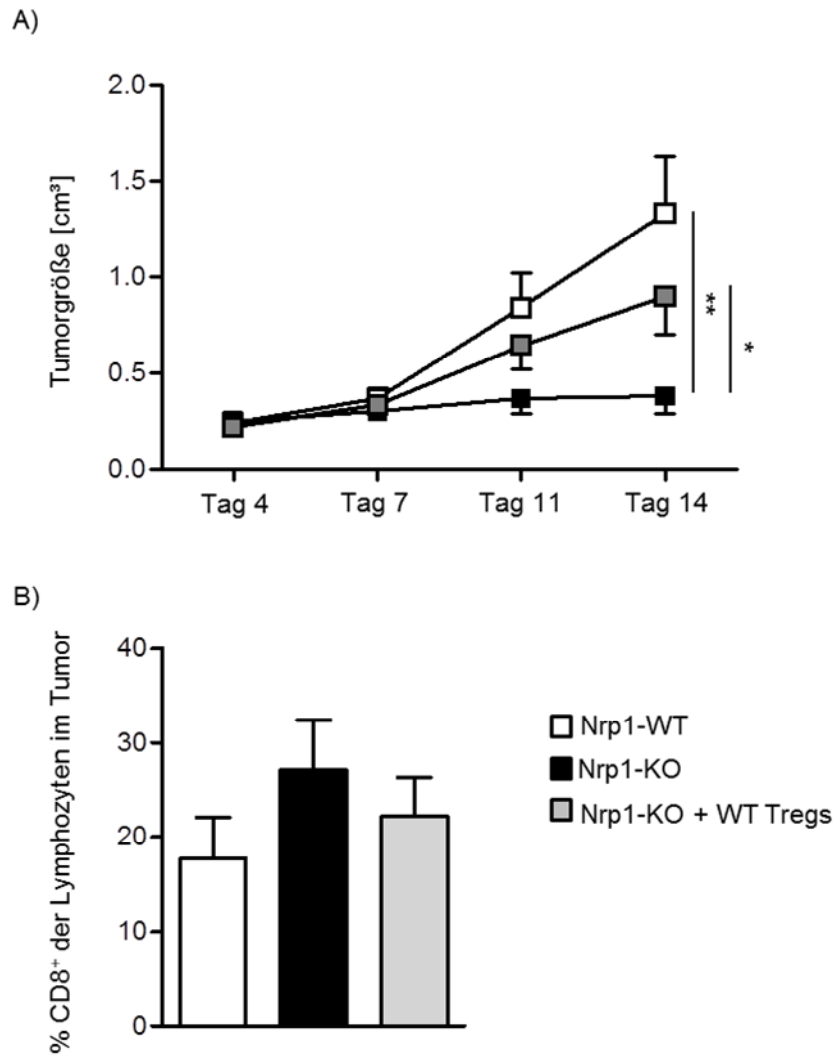


Abb. 3.18: Der Transfer von WT Nrp1-positiven CD4⁺CD25⁺ T-Zellen kann den Phänotyp in Tumor-tragenden Nrp1-KO Mäusen aufheben. 5×10^5 Zellen der etablierten MT/*ret* Tumorzelllinie wurden in Nrp1-WT und Nrp1-KO Mäuse transplantiert und die Tumorgroße in regelmäßigen Abständen gemessen. Eine Gruppe von Nrp1-KO Tieren erhielt zusätzlich am Tag der Transplantation 8×10^5 Nrp1⁺ Tregs i.v. 14 Tage nach Transplantation wurde der Tumor präpariert und im Hinblick auf die Population der CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. (A) Tumolvolumina wurden an Tag 4, 7, 11 und 14 mittels Schieblehre gemessen. (B) Anteil an CD8⁺ T-Zellen im Tumor wurde an Tag 14 nach Transplantation durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler zusammengefasst aus vier unabhängigen Experimenten mit $n = 8 - 11$ Mäuse pro Gruppe. (Student's *t*-test ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$) Daten veröffentlicht in: Hansen et al. 2012

Durch die Verpaarung von CD4-cre mit Nrp1^{flox/flox} Mäusen ergibt sich eine Deletion von Neuropilin-1, die spezifisch die CD4⁺ T-Zellen, insbesondere die sonst hoch Nrp1-positiven Tregs betrifft. Obwohl keine Reduktion der suppressiven Eigenschaften von Nrp1^{-/-} Tregs *in vitro* festgestellt werden konnte, entwickeln Nrp1-KO Mäuse eine verstärkte Immunantwort auf die Transplantation von MT/*ret* Melanomzellen, was ein verlangsamtes Wachstum des Tumors sowie eine erhöhte

Infiltration und Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zur Folge hat. Ein ähnlicher Effekt kann auch durch die Deletion von VEGF auf den transplantierten Tumorzellen, sowie durch die spezifische Deletion von Nrp1 auf Foxp3-positiven Tregs erzielt werden, was auf eine VEGF-abhängige Migration der Nrp1⁺ Tregs in den Tumor hindeutet. Durch den adoptiven Transfer von WT Tregs kann der Tumorphänotyp in Nrp1-KO Mäusen aufgehoben werden. Somit scheint die Nrp1 Expression auf regulatorischen T-Zellen an der Infiltration von Tregs in VEGF-produzierende Gewebe beteiligt zu sein.

4 Diskussion

Die Population der CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und des Gleichgewichts zwischen effizienten Immunantworten und der Regulation des Immunsystems zur Vermeidung von Autoimmunpathologien. Auf der anderen Seite können Tregs aber auch eine effiziente anti-Tumor Immunantwort oder die vollständige Beseitigung einer Infektion verhindern. Daher stellen Tregs ein attraktives *Target* für die Therapien verschiedener Erkrankungen dar. So konnten bereits Tregs eingesetzt werden, um Autoimmunerkrankungen zu behandeln oder durch ihre Expansion Toleranz gegenüber Transplantaten zu erreichen (Miyara and Sakaguchi, 2011).

Voraussetzung für die Verwendung regulatorischer T-Zellen für therapeutische Zwecke ist eine genaue Charakterisierung ihres Phänotyps und ihrer Funktion, sowie das Verständnis der Mechanismen, die der Regulation in den unterschiedlichen pathologischen und physiologischen Zusammenhängen zugrundeliegen, um so weitere Möglichkeiten zu entwickeln, Tregs für die Therapie zu manipulieren, zu depletieren oder zu expandieren.

Im Zuge von Genexpressionsanalysen in der Maus konnte in einer vorangegangenen Studie Neuropilin-1 (Nrp1) als Treg-spezifisches Oberflächenmolekül identifiziert werden. Der ursprünglich im Nervensystem entdeckte Rezeptor wird in Korrelation mit Foxp3 exprimiert und CD4⁺Nrp1^{high} T-Zellen zeigen suppressives Verhalten *in vitro* (Bruder et al., 2004; Loser et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass Nrp1 an der Ausbildung der immunologischen Synapsen zwischen Tregs und DCs beteiligt ist (Sarris et al., 2008), und dass die Expression von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen den Krankheitsverlauf der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) mildern kann (Solomon et al., 2011). Da die genaue Funktion von Nrp1 in der T-Zellbiologie aber noch weitestgehend unverstanden ist, sollte diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch weiterführende Analysen detailliert charakterisiert werden.

Dafür stand eine transgene Maus zur Verfügung, die Nrp1 unter der Kontrolle des CD4 Promotors exprimiert, was zu einer spezifischen Überexpression von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen, und hier insbesondere in der Population der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen führt (Abb. 3.2). Durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass die Überexpression

von Nrp1 keinen Einfluss auf die Entwicklung und Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen oder der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen hat (Abb. 3.4).

CD4⁺Nrp1^{high} T-Zellen supprimieren *in vitro* die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ *Responder* T-Zellen nach Aktivierung (Bruder et al., 2004), was die Vermutung nahelegt, dass Nrp1 in der suppressiven Aktivität von Tregs involviert ist. Allerdings konnte durch die transgene Überexpression von Nrp1 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen keine suppressive Aktivität *in vitro* erreicht werden (Abb. 3.7). Das bedeutet, während Foxp3 die Expression von Nrp1 induzieren kann (Loser et al., 2005), scheint Nrp1 umgekehrt nicht in der Lage zu sein, Foxp3 hochzuregulieren (Abb. 3.4), was eine Beteiligung des Rezeptors an der regulatorischen Funktion von CD4⁺ T-Zellen eher unwahrscheinlich macht.

Die weiterführende Untersuchung des molekularen Phänotyps der CD4-Nrp1 transgenen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mittels *Microarray*-Technologie zeigte ein verändertes Genexpressionsprofil nach 48-stündiger Aktivierung *in vitro* im Vergleich zu WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, welches darauf hindeutet, dass Neuropilin-1 die Expression von Genen beeinflussen könnte, die im Zusammenhang mit der Aktivierung des T-Zellrezeptors stehen (Abb. 3.5). Auch die durchflusszytometrischen Analysen der *in vitro* stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ergaben, dass Zellen aus CD4-Nrp1 transgenen Mäusen Aktivierungs-abhängige Moleküle, wie z.B. das pro-inflammatorische Zytokin IL-2 oder den Oberflächenrezeptor CTLA-4 in geringerem Maße hochregulieren als Zellen aus WT Mäusen (Abb. 3.6). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen der CD4⁺ T-Zellen aus CD4-Nrp1 transgenen Mäusen könnten eventuell auf eine Rolle von Nrp1 in der T-Zellrezeptor-abhängigen Signalgebung in Tregs hindeuten.

Des Weiteren kam es zu einer leichten Reduktion der proliferativen Aktivität transgener CD4⁺CD25⁻ T-Zellen *in vitro* sowohl nach polyklonaler als auch nach Antigen-spezifischer Stimulation im Vergleich zu Zellen aus WT Mäusen (Abb. 3.7 und 3.9). Außerdem sekretierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen nach *in vitro* Stimulation tendenziell geringere Mengen pro-inflammatorischer Zytokine (Abb. 3.8). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass Nrp1 in regulatorischen T-Zellen an der Hyporesponsivität nach Stimulation des T-Zellrezeptors beteiligt ist.

Da Nrp1 auch in bis zu 10 % der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimiert wird, könnte es auch hier unter bestimmten Umständen die Aktivierung durch den T-Zellrezeptor beeinflussen. So wurde z.B. gezeigt, dass die Expression von Nrp1 zu einer verlängerten Interaktion von T-Zellen mit unreifen dendritischen Zellen führt, die vermutlich in Abwesenheit pro-inflammatorischer Signale einen tolerogenen Effekt auf das Immunsystem haben (Sarris et al., 2008).

Da *in vitro* Analysen immer nur eine sehr spezifische Situation unter vorgegebenen Bedingungen darstellen und viele, oft auch unbekannte, Mediatoren und Einflüsse des komplexen physiologischen Systems fehlen, sollten *in vivo* Versuche mit den CD4-Nrp1 Mäusen nun Aufschluss darüber geben, wie sich die Überexpression des Rezeptors auf die wesentlich komplexere Immunantwort in der *in vivo*-Situation auswirkt. Solomon et al. zeigten, dass der adoptive Transfer von Nrp1-transfizierten CD4⁺ T-Zellen Mäuse vor der Erkrankung an experimenteller Autoimmunenkephalitis (EAE) schützt und vermuten, dass dies auf eine Regulation der für die EAE verantwortlichen T_H17 T-Zell Expansion durch die Nrp1⁺CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen ist (Solomon et al., 2011).

Im INS-HA x Rag2-KO Modell hingegen zeigte sich ein verfrühtes Einsetzen der Diabetes nach der Injektion von CD4-Nrp1 transgenen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen im Vergleich zu WT Zellen (Abb. 3.10). Analog zu den Ergebnissen der *in vitro* Analysen zeigten aber auch hier die CD4-Nrp1 transgenen Zellen eine tendenziell reduzierte Aktivierung, was vermuten lässt, dass diese nicht der Grund für den verstärkten Phänotyp ist. Es konnte allerdings eine erhöhte Anzahl an Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Pankreas von Mäusen gefunden werden, die CD4-Nrp1 transgene Zellen erhalten hatten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Neuropilin-1 auch an der Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in entzündliche Gewebe beteiligt ist. Dass Nrp1 eine Rolle bei der Zellmigration spielt, konnte bereits 2003 an humanen Endothelzellen demonstriert werden, die nach der Transfektion mit einer Rezeptor-chimäre Liganden-abhängige Migration, aber keine Proliferation zeigten (Wang et al., 2003). Um den gezeigten Phänotyp weiter zu untersuchen, soll in zukünftigen Studien im INS-HA Modell eine weiterführende Analyse der Lymphozyten in der Bauchspeicheldrüse erfolgen. Beispielsweise kann über die Injektion des Thymidinanalogs BrdU (Bromdesoxyuridin), welches im Laufe des Zellzyklus in die

DNA inkorporiert und so als Marker für Proliferation dient, untersucht werden, ob tatsächlich eine Expansion durch erhöhte migratorische Aktivität oder aber durch verstärkte Proliferation für den steigenden Anteil an Antigen-spezifischen Lymphozyten im Pankreas verantwortlich ist.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Analysen darauf hin, dass Neuropilin-1 weder an der Entwicklung, noch an der regulatorischen Aktivität von CD4⁺ T-Zellen beteiligt ist, sondern eine Rolle in der T-Zellrezeptor-abhängigen Signaltransduktion spielen könnte. Jedoch konnten nur tendenzielle, aber keine signifikanten Unterschiede in der Expression der analysierten Moleküle nach Aktivierung, in der Menge sekretierter Zytokine oder in der proliferativen Kapazität festgestellt werden. Vermutlich reicht die eher geringe Überexpression von nur etwa 20 % Nrp1-positiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in CD4-Nrp1 Mäusen im Vergleich zu ca. 10 % im WT nicht aus, um signifikante Unterschiede im Phänotyp der Zellen hervorzurufen. Eine Möglichkeit weiterführender Untersuchungen wäre, Neuropilin-1 mit Hilfe eines Retrovirus in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu exprimieren und nur Nrp1-positive Zellen für vergleichende *in vitro*-Analysen zu verwenden. Des Weiteren könnte man auch für die *in vivo* Versuche Nrp1 in HA-spezifischen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mittels retroviralem Gentransfer exprimieren, um anschließend über die durchflusszytometrische Sortierung der Zellen anhand eines co-exprimierten Markermoleküls einen höheren Anteil an Nrp1-positiven Zellen in die Versuchstiere injizieren zu können. Unterschiede in der Migration im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten T-Zellen könnten sich so wesentlich deutlicher abzeichnen als bei der Verwendung der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus den CD4-Nrp1 Mäusen, die noch immer einen verhältnismäßig hohen Anteil von bis zu 80 % an Nrp1-negativen Zellen enthalten.

Als Alternative bestünde die Option, CD4⁺CD25⁻Nrp1⁺ und CD4⁺CD25⁻Nrp1⁻ T-Zellen durchflusszytometrisch zu sortieren und für Analysen zu verwenden. Hierbei ist zu beachten, dass die Population der CD4⁺CD25⁻Nrp1⁺ T-Zellen in WT Mäusen einen noch geringeren Anteil der CD4⁺ T-Zellpopulation ausmacht als die Subpopulation der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen, was das Spektrum der durchführbaren Versuche stark einschränkt. Auch die Verwendung retroviral transfizierter CD4⁺ T-Zellen birgt gewisse Nachteile, da es sich bei den für die Transfektion isolierten

Zellen um reife T-Zellen handelt, so dass keine Rückschlüsse über einen möglichen Einfluss der Nrp1 Expression auf die Entwicklung gezogen werden können.

Nrp1 ist ein multifunktionelles Protein, das auf Zellen des Nervensystems, auf Endothelzellen, Tumorzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Epithelzellen und Zellen des Immunsystems exprimiert wird und mit einer Vielzahl von Liganden aus den unterschiedlichsten Familien interagiert (Koch, 2012). Dabei kann es, wie im Fall von TGF- β , als alleiniger Rezeptor fungieren (Glinka and Prud'homme, 2008), als Co-Rezeptor die Bindung eines Liganden vermitteln, wie z.B. als VEGF-A Co-Rezeptor des VEGF-Rezeptor 2 (Ferrara et al., 2003) oder aber über homophile *trans*-Interaktionen am Zell-Zell-Kontakt beteiligt sein (Chen and Liu, 2009; He and Tessier-Lavigne, 1997). Da in den CD4-Nrp1 transgenen Mäusen zwar eine Überexpression von Nrp1 auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erreicht werden konnte, jedoch noch immer ein nicht zu vernachlässigender Anteil an Nrp1-negativen CD4⁺ T-Zellen verblieb, sollten für weitere Untersuchungen der Funktion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen nun die Auswirkungen der Deletion des Rezeptors analysiert werden. Durch die Verpaarung von Nrp1-gefloxten Mäusen mit CD4-cre Mäusen konnte eine spezifische Deletion von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen, insbesondere in den sonst hoch positiven CD4⁺CD25⁺ T-Zellen erreicht werden (Abb. 3.11). Co-Kultur Experimente mit CD4⁺CD25⁻ *Responder*-Zellen ergaben keine Unterschiede in den suppressiven Fähigkeiten Nrp1-defizienter CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus Nrp1-WT Mäusen (Abb. 3.13). Auch im humanen System wurde gezeigt, dass Nrp1-positive CD4⁺CD25^{high} Tregs zwar *in vitro* die Proliferation autologer T-Zellen inhibieren können, die Zugabe von anti-Nrp1 Antikörpern dies aber nicht beeinflusst (Battaglia et al., 2007). Weiterführende Inhibitionstests zeigen außerdem, dass auch die Suppression der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen *in vitro* nicht durch die Deletion von Nrp1 auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen beeinträchtigt wird (Hansen et al., 2012).

Natürliche CD4⁺CD25⁺ T-Zellen exprimieren also Nrp1 und besitzen suppressive Aktivität. Die hier gezeigten Ergebnisse sowohl der Überexpression als auch der Deletion in CD4⁺ T-Zellen deuten aber darauf hin, dass Nrp1 nicht direkt an der Inhibition von *Responder*-Zellen beteiligt ist. Unsere Analysen der Nrp1-KO Mäuse ergaben hingegen, dass die T-Zell-spezifische Deletion in den Nrp1-KO Mäusen

entscheidende Folgen für den Verlauf der Immunantwort gegen die Melanom-entstehung im MT/*ret* Tumormodell hat (Abb. 3.14). So zeigten Nrp1-KO Mäuse ein signifikant reduziertes Tumorstadium im Vergleich zu Nrp1-WT Mäusen.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass eine verstärkte Infiltration von CD8⁺ T-Zellen in den Tumor, sowie ein höheres CD8⁺/Treg Verhältnis mit einer besseren Prognose für Krebspatienten und einer verringerten Metastasierung assoziiert ist (Piersma et al., 2007). Auch in murinen Tumormodellen führte eine erhöhte Infiltration von Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, ermöglicht durch eine Depletion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen zu einer verbesserten anti-Tumor Immunantwort und sogar zu einer vollständigen Rejektion des Tumors (Kline et al., 2008).

Auch im MT/*ret* Modell wurde ein reduziertes Tumorstadium von einer erhöhten Anzahl an Tumor-infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen begleitet, die außerdem stärker aktiviert waren, als CD8⁺ T-Zellen aus Tumoren von Nrp1-WT Mäusen (Abb. 3.14). Dieser Phänotyp erinnert an die Ergebnisse, die Suttmüller et al. 2001 veröffentlichten: Sie zeigten, dass die Depletion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in einem Melanommodell zu reduziertem Tumorstadium führt, was auf eine verstärkte Aktivierung von Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist (Suttmüller et al., 2001). Des Weiteren ist bekannt, dass die Depletion regulatorischer T-Zellen mittels α -CD25 Antikörpern (Onizuka et al., 1999) und auch die spezifische Depletion von Foxp3⁺ T-Zellen (Hansen et al., 2012; Klages et al., 2010) das Tumorstadium verhindern kann, während eine erhöhte Anzahl von Tregs im Blut von Krebspatienten häufig mit einem schlechten Krankheitsverlauf korreliert (Nishikawa and Sakaguchi, 2010). Dies wird damit begründet, dass Tregs die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen den Tumor unterdrücken (Dunn et al., 2004).

Da CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Nrp1-KO Mäusen wildtypische suppressive Aktivität *in vitro* zeigen, müssen andere Mechanismen durch die Deletion von Nrp1 betroffen sein, die die Rekrutierung und Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen im Tumor begünstigen. Es ist bekannt, dass Nrp1 sowohl in humanen Endothelzellen (Wang et al., 2003) als auch in der neuronalen Entwicklung (He and Tessier-Lavigne, 1997) eine Rolle bei der Migration unterschiedlichster Zelltypen spielt. Da Tregs *in vivo* in der Lage sein müssen, in das betroffene Gewebe einzuwandern, um den für die Suppression benötigten Kontakt mit anderen Zellen des Immunsystems herzustellen (von Boehmer, 2005), könnte eine Veränderung der Rekrutierung der Nrp1-defizienten

Tregs in den Tumor für die verbesserte anti-Tumor Immunantwort verantwortlich sein. Cryoschnitte der Tumore (zur Verfügung gestellt von Dr. Iris Helfrich, Essen) von Nrp1-KO Mäusen zeigten eine Störung der Infiltration von Foxp3⁺ T-Zellen in den Tumor, so dass es zu einer Lokalisation der Zellen am äußeren Tumorrand kommt. Nrp1-WT Mäuse hingegen zeigten eine homogene Verteilung der Tregs im Tumorgewebe (Abb. 3.15). Aktuelle Studien an Brustkrebskarzinomen deuten darauf hin, dass eine erhöhte Anzahl von Tregs im Tumorinneren mit der Expression des Onkogens HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) im Tumor, reduzierter Überlebensrate und ungünstigen histologischen Umständen korreliert (Liu et al., 2011). Fanden sich die erhöhten Treg Zahlen hingegen im an den Tumor angrenzenden Gewebe, war dies mit einer erhöhten Überlebensrate assoziiert (Liu et al., 2011). Das Verhältnis zwischen intra- und peritumoralen Tregs scheint somit von essenzieller Bedeutung für den Verlauf der anti-Tumor Immunantwort zu sein. Da die *in vitro* Analysen zeigten, dass es aufgrund der Nrp1-Deletion nicht zu einer erhöhten proliferativen Aktivität der Nrp1-KO CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Vergleich zu Nrp1-WT Zellen kommt (Abb. 3.13), ist eine Beteiligung von Nrp1 an der Infiltration der Tregs in den Tumor naheliegend. Bereits 2003 wurde gezeigt, dass Nrp1 die Migration humaner Endothelzellen in Richtung VEGF vermittelt (Wang et al., 2003). Auch die Migration während der neuronalen Entwicklung der Gesichtsnerven ist abhängig von Nrp1 und VEGF (Schwarz et al., 2004) und während der Angiogenese vermittelt Nrp1 die VEGF-abhängige Migration von humanen Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (Banerjee et al., 2008). Saban et al. zeigten 2010, dass Entzündungen der Blase zu einem erhöhtem VEGF-Level und einer erhöhten Infiltration von Immunzellen führen, die durch die Gabe von α -Nrp1 Antikörper abgeschwächt wird (Saban et al., 2010).

Inzwischen ist bekannt, dass Zellen unterschiedlichster Tumore, wie Glioblastomzellen (Plate et al., 1992) und Zellen aus humanen Darmtumoren VEGF produzieren und eine hohe VEGF Expression mit verstärkter Metastasenbildung korreliert (Takahashi et al., 1995). Außerdem gibt es positive Korrelationen zwischen der VEGF-Konzentration und dem prozentualen Anteil an Tregs innerhalb der CD4⁺ T-Zellen in Brustkrebspatienten (Gupta et al., 2007) und VEGF-produzierende Zellen aus Leberkarzinomen induzieren in *in vitro* Co-Kulturen Tregs in PBMCs (Wada et al., 2009). Erste *in vitro* Daten zeigen, dass auch Zellen einer Nrp1-exprimierenden

T-Zelllinie in Richtung VEGF migrieren (Hansen et al., 2012), eine Interaktion zwischen vom Tumor produziertem VEGF und auf Tregs exprimiertem Nrp1 könnte also an der Infiltration regulatorischer T-Zellen in den Tumor beteiligt sein. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse unterstützt, die zeigten, dass auch die Deletion von VEGF auf injizierten Tumorzellen einen ähnlichen Phänotyp zur Folge hat wie die Deletion von Nrp1 auf Tregs, während durch die Kombination von VEGF-defizienten Fibroblasten und Nrp1-defizienten Tregs in Nrp1-KO Mäusen kein additiver Effekt erreicht wurde (Abb. 3.16). Durchflusszytometrische Analysen zeigten auch in diesem Fibrosarkom Modell einen Zusammenhang zwischen reduziertem Tumorwachstum und erhöhter Infiltration des Tumors durch CD8⁺ T-Zellen, bedingt durch einen geringeren Anteil an Foxp3-positiven CD4⁺ T-Zellen im Tumorgewebe, sowohl in Tumoren von Nrp1-WT Mäusen, die VEGF-defiziente Fibroblasten erhalten hatten, als auch in Nrp1-KO Tieren, unabhängig davon, ob sie VEGF^{+/+} oder VEGF^{-/-} Zellen erhalten hatten (Abb. 3.16). Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Nrp1 auch in regulatorischen T-Zellen, ähnlich wie in Endothelzellen beschrieben (Kawamura et al., 2008), für die VEGF-abhängige Migration verantwortlich sein könnte.

Allerdings basieren diese Ergebnisse auf Versuchen, die mit Nrp1^{flox/flox} x CD4-Cre Mäusen durchgeführt wurden, in denen es zu einer Deletion von Nrp1 in allen CD4⁺ T-Zellen kommt. Im humanen System wurde gezeigt, dass Neuropilin-1 auch auf naiven T-Zellen exprimiert wird und eine Rolle bei der Aktivierung spielt (Tordjman et al., 2002). Da auch ein geringer Teil der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in WT-Nrp1 Mäusen Nrp1 exprimiert (Abb. 3.11 D), könnten diese CD25⁻Nrp1⁺ T-Zellen ebenfalls der Auslöser für den beobachteten Phänotyp sein. Daher wurde nun die anti-Tumor Immunantwort in Mäusen analysiert, die eine Treg-spezifische Nrp1-Deletion unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors tragen (FIC-Nrp1-KO). Auch hier kam es nach der subkutanen Transplantation von Zellen der CT-26 Darmkrebs Zelllinie, zu einer erhöhten Infiltration des Tumors durch aktivierte CD8⁺ T-Zellen einhergehend mit einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in FIC-Nrp1-KO Mäusen im Vergleich zum WT (Abb. 3.17). Daraus lässt sich ableiten, dass die Deletion von Nrp1 in Foxp3⁺CD25⁺, nicht aber in Foxp3⁻CD25⁻ CD4⁺ T-Zellen der Nrp1-KO Mäuse für den Phänotyp des reduzierten Tumorwachstums verantwortlich ist. Des Weiteren konnte der adoptive Transfer von durchflusszytometrisch sortierten CD4⁺CD25⁺ T-

Zellen aus WT Mäusen die effizientere anti-Tumor Antwort in Nrp1-KO Mäusen unterdrücken, so dass das Tumorwachstum mit dem in Nrp1-WT Mäusen vergleichbar war (Abb. 3.18). Sowohl die Analysen der anti-Tumor Immunantwort in FIC-Nrp1-KO Mäusen als auch das Resultat des Transfers von WT $CD4^+CD25^+$ Tregs in Tumor-tragende Nrp1-KO Mäuse sprechen dafür, dass Nrp1 auf regulatorischen T-Zellen, nicht aber auf $CD4^+CD25^-$ T-Zellen für die Unterdrückung der anti-Tumor Immunantwort verantwortlich ist. Diese Daten gehen einher mit Ergebnissen früherer Studien, die belegen, dass der Co-Transfer von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen zu einer Unterdrückung der Immunantwort durch Tumor-Antigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellen führt (Antony et al., 2005).

Die Unterdrückung der anti-Tumor Immunantwort durch regulatorische $CD4^+$ T-Zellen ist vermutlich eine der entscheidenden Strategien, mit deren Hilfe es Tumorzellen gelingt, der Kontrolle durch das Immunsystem zu entkommen. Bisher konnte zwar gezeigt werden, dass Tregs, die den Rezeptor CCR4 exprimieren, durch dessen Ligand CCL22 in den Tumor rekrutiert werden (Curiel et al., 2004), doch, wie viele andere Moleküle, wird CCR4 auch auf Effektor- und Gedächtnis- $CD4^+$ T-Zellen exprimiert (Gehad et al., 2012; Wang et al., 2010), wo er ebenfalls an der Migration der Zellen in entzündliche Gewebe beteiligt ist. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch vom Tumor produziertes VEGF die Infiltration von Tregs in das Tumorgewebe *via* Neuropilin-1 auslöst. Diese Interaktion konnte in den unterschiedlichen Tumormodellen sowohl durch die Deletion von Nrp1 auf Tregs als auch durch die Deletion von VEGF in den Tumorzellen unterbunden werden, was ein reduziertes Tumorwachstum und eine erhöhte Rekrutierung und Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen zur Folge hatte.

In zukünftigen Studien muss nun analysiert werden, ob die Migration von $Foxp3^+$ Tregs in Richtung VEGF ein spezieller Vorgang während der Tumorentstehung ist, oder ob er auch in anderen Krankheiten eine Rolle spielt, die mit einer erhöhten VEGF Produktion einhergehen. Ein erster Hinweis könnte der erhöhte Anteil von $CD4$ -Nrp1 transgenen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen im INS-HA Modell sein, welcher auf eine Rolle von Nrp1 in der Infiltration der Zellen hindeuten könnte. Weitergehende Analysen im Hinblick auf den Phänotyp der in den Pankreas infiltrierenden T-Zellen sowie auf die VEGF-Expression in der Bauchspeicheldrüse könnten interessante

Erkenntnisse liefern. Darüber hinaus sollte man vergleichbare Analysen auch in einem Antigen-unspezifischen Modell durchführen, da die Expression des spezifischen Antigens im Pankreas der INS-HA Mäuse zur Infiltration der HA-spezifischen Immunzellen führt, welche wiederum erst die Entzündungsreaktion auslösen. Hierfür könnte man fluoreszenzmarkierte, Nrp1-positive oder Nrp1-negative CD4⁺ T-Zellen in Mäuse injizieren, die VEGF unter der Kontrolle des Ratten Insulin Promoters im Pankreas exprimieren (Rip-VEGF, G. Christofori, Basel) und das Migrationsverhalten der Zellen *in vivo* untersuchen. Des Weiteren wurde z.B. gezeigt, dass sowohl Multiple Sklerose Patienten, als auch Mäuse, die an experimenteller Autoimmunenzephalitis (EAE) erkrankt sind, überdurchschnittlich hohe VEGF-Level aufweisen, und dass die Stärke der VEGF-Expression positiv mit dem Grad der Erkrankung korreliert (Proescholdt et al., 2002; Roscoe et al., 2009). In demselben Modell ergaben Experimente mit Nrp1^{flox/flox} x CD4-cre (Nrp1-KO) Mäusen, dass die Deletion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen zu einem schwerwiegenderen Verlauf der EAE führt, während die transgene Expression von Nrp1 in CD4⁺ T-Zellen den EAE-Verlauf abmildert (Solomon et al., 2011). Auch diese Ergebnisse könnten auf eine verminderte VEGF-abhängige Infiltration der Nrp1-KO Tregs in das zentrale Nervensystem der Mäuse zurückzuführen sein, welche zu einer verminderten Suppression der T-Zell-anhängigen pro-inflammatorischen Autoimmunität führen könnte.

Durch die Analyse sowohl der Nrp1-überexprimierenden CD4-Nrp1 Mauslinie als auch der Nrp1-defizienten Nrp1-KO Mauslinie konnten interessante Erkenntnisse hinsichtlich der Funktion von Neuropilin-1 auf CD4⁺ regulatorischen T-Zellen gewonnen werden. Neben einer möglichen modulierenden Aufgabe bei der Hyporesponsivität von Tregs nach Aktivierung der T-Zellrezeptor Signalkaskade, spielt Nrp1 insbesondere bei der VEGF-abhängigen Migration von Tregs in Tumorgewebe eine übergeordnete Rolle. Die Blockierung dieses Mechanismus führt zu einer verbesserten anti-Tumor Immunantwort und könnte somit eine vielversprechende Strategie in der Krebstherapie darstellen, die Einwanderung regulatorischer T-Zellen in das Tumorgewebe zu verhindern. Insbesondere in Kombination mit dem Einsatz von *in vitro* generierten, Tumorantigen-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen würde sich somit die Möglichkeit ergeben, therapeutische Ansätze zu verbessern. Denkbar wäre hier eine spezifische Inhibition der Nrp1 Expression auf CD4⁺ T-Zellen mittels

RNAi (engl. *RNA interference*). Dies könnte durch die Applikation von α -Nrp1 siRNA (engl. *silencing RNA*) enthaltenden Lipid-Nanopartikeln erreicht werden, die spezifisch an CD4⁺ T-Zellen binden. Ein ähnliches System von CD4-spezifischen Nanopartikeln zur Applikation von antiviralen Medikamenten konnte bereits in der HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) Therapie entwickelt werden (Endsley and Ho, 2012a, b). Eine ubiquitäre Depletion aller Tregs im Organismus, die häufig zu unerwünschten Immunpathologien führt, könnte somit umgangen werden.

5 Zusammenfassung

In einer vorangegangenen Studie konnte Neuropilin-1 (Nrp1) als spezifischen Oberflächenmarker auf murinen CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen identifiziert werden (Bruder et al., 2004). Über die Funktion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen gibt es aber nach wie vor nur wenige Erkenntnisse. Aktuelle Studien suggerieren, dass Nrp1 die Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und dendritischen Zellen moduliert (Sarris et al., 2008), als Rezeptor, sowohl für die latente, als auch für die aktive Form von TGF- β fungiert (Glinka and Prud'homme, 2008), und dass Nrp1 zur Funktion regulatorischer T-Zellen in einem Modell für Entzündung im zentralen Nervensystem der Maus beiträgt (Solomon et al., 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit verschaffen einen tieferen Einblick in die Funktion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen. Untersuchungen an einer transgenen Mauslinie, die Nrp1 spezifisch in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen überexprimiert (CD4-Nrp1), liefern erste Hinweise auf eine Rolle von Nrp1 in der Modulation der T-Zellrezeptor-abhängigen Signalkaskade. Vergleichende Genexpressionsanalysen von *in vitro* stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen dieser Mäuse ergaben eine reduzierte Expression von Genen, die mit der Aktivierung des T-Zellrezeptors assoziiert werden. Auch Realtime PCR und FACS-Analysen von *in vitro* stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nrp1 Mäusen zeigten eine tendenziell, nicht aber signifikant, reduzierte Aktivierung im Vergleich zu Zellen aus WT Tieren. Außerdem kam es durch die transgene Expression von Nrp1 zu einer leichten Reduktion der proliferativen Kapazität der CD4⁺ T-Zellen *in vitro*. Interessanterweise konnte eine suppressive Aktivität *in vitro* durch die Überexpression von Nrp1 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht induziert werden. Hingegen zeigte sich aber nach dem Transfer in ein Autoimmun-Mausmodell eine leichte Akkumulation der Nrp1-überexprimierenden T-Zellen in dem Gewebe, dass ihr spezifisches Antigen exprimiert.

Weiterführende Analysen an Mäusen, in denen die Expression von Nrp1 spezifisch in CD4⁺ T-Zellen ausgeschaltet ist (Nrp1-KO) konnten eine entscheidende Rolle von Nrp1 an der Migration von Tregs belegen. Obwohl Co-Kultur Experimente zeigten, dass die suppressiven Fähigkeiten von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch die Deletion von Nrp1 nicht beeinträchtigt werden, kam es in Nrp1-KO Mäusen zu einem

bemerkenswerten Phänotyp in der Tumorentstehung. Dieser äußert sich, ebenso wie in Mäusen, in denen Nr1 spezifisch in Foxp3⁺ Tregs ausgeschaltet ist (FIC-Nr1-KO), in signifikant verlangsamtem Tumorwachstum, begleitet von erhöhter Rekrutierung und Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in den Tumor. Hingegen konnte eine reduzierte Infiltration von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in den Tumor festgestellt und auf die Interaktion zwischen Tumor-sekretiertem VEGF und auf den Tregs exprimiertem Nr1 zurückgeführt werden.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Nr1 an der Migration von Tregs in Abhängigkeit von VEGF beteiligt ist. Inwieweit dies einen Tumor-spezifischen Mechanismus darstellt, oder ob dieser auch im Verlauf anderer Immunantworten eine Rolle spielt, soll in zukünftigen Studien geklärt werden.

6 Literatur

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.

Andreasen, S.Ø., Christensen, J.E., Marker, O., and Thomsen, A.R. (2000). Role of CD40 Ligand and CD28 in Induction and Maintenance of Antiviral CD8+ Effector T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 164, 3689-3697.

Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpinarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., *et al.* (2005). CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *Journal of immunology* 174, 2591-2601.

Anz, D., Mueller, W., Golic, M., Kunz, W.G., Rapp, M., Koelzer, V.H., Ellermeier, J., Ellwart, J.W., Schnurr, M., Bourquin, C., *et al.* (2011). CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 2417-2426.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Banerjee, S., Mehta, S., Haque, I., Sengupta, K., Dhar, K., Kambhampati, S., Van Veldhuizen, P.J., and Banerjee, S.K. (2008). VEGF-A165 induces human aortic smooth muscle cell migration by activating neuropilin-1-VEGFR1-PI3K axis. *Biochemistry* 47, 3345-3351.

Barrat, F.J., Cua, D.J., Boonstra, A., Richards, D.F., Crain, C., Savelkoul, H.F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R.L., Hawrylowicz, C.M., and O'Garra, A. (2002). In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *The Journal of experimental medicine* 195, 603-616.

Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews Immunology* 2, 401-409.

Barry, M., Heibei, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20, 3781-3794.

Battaglia, A., Buzzonetti, A., Monego, G., Peri, L., Ferrandina, G., Fanfani, F., Scambia, G., and Fattorossi, A. (2007). Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology* 123, 129-138.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune

dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21.

Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Becourt, C., and Lucas, B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *Journal of immunology* 175, 246-253.

Bilate, A.M., and Lafaille, J.J. (2012). Induced CD4(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annu Rev Immunol* 30, 733-758.

Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., *et al.* (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1303-1310.

Bour-Jordan, H., and Blueston, J.A. (2002). CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of clinical immunology* 22, 1-7.

Bruder, D., Probst-Keppler, M., Westendorf, A.M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J., and Hansen, W. (2004). Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34, 623-630.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.

Buonavista, N., Balzano, C., Pontarotti, P., Le Paslier, D., and Golstein, P. (1992). Molecular linkage of the human CTLA4 and CD28 Ig-superfamily genes in yeast artificial chromosomes. *Genomics* 13, 856-861.

Cambiaggi, C., Scupoli, M.T., Cestari, T., Gerosa, F., Carra, G., Tridente, G., and Accolla, R.S. (1992). Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics* 36, 117-120.

Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635-646.

Chen, C., and Liu, C.P. (2009). Regulatory function of a novel population of mouse autoantigen-specific Foxp3 regulatory T cells depends on IFN-gamma, NO, and contact with target cells. *PLoS One* 4, e7863.

Chen, M.L., Yan, B.S., Bando, Y., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2008). Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 180, 7327-7337.

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.

- Chen, Z., and O'Shea, J.J. (2008). Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunologic research* 41, 87-102.
- Clark, L.B., Appleby, M.W., Brunkow, M.E., Wilkinson, J.E., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (1999). Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol* 162, 2546-2554.
- Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., *et al.* (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 102, 4107-4114.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 10, 942-949.
- Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30, 626-635.
- de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6, 24-37.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1257-1265.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Ellis, L.M. (2006). The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 5, 1099-1107.
- Ellmeier, W., Sawada, S., and Littman, D.R. (1999). The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol* 17, 523-554.
- Endsley, A.N., and Ho, R.J. (2012a). Design and characterization of novel peptide-coated lipid nanoparticles for targeting anti-HIV drug to CD4 expressing cells. *Aaps J* 14, 225-235.
- Endsley, A.N., and Ho, R.J. (2012b). Enhanced anti-HIV efficacy of Indinavir after inclusion in CD4 targeted lipid nanoparticles. *J Acquir Immune Defic Syndr*.
- Ercolini, A.M., Ladle, B.H., Manning, E.A., Pfannenstiel, L.W., Armstrong, T.D., Machiels, J.P., Bieler, J.G., Emens, L.A., Reilly, R.T., and Jaffee, E.M. (2005). Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine* 201, 1591-1602.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 1206-1212.

- Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 9, 669-676.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-341.
- Fujisawa, H., Takagi, S., and Hirata, T. (1995). Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev Neurosci* 17, 343-349.
- Gehad, A., Al-Banna, N.A., Vaci, M., Issekutz, A.C., Mohan, K., Latta, M., and Issekutz, T.B. (2012). Differing Requirements for CCR4, E-Selectin, and alpha4beta1 for the Migration of Memory CD4 and Activated T Cells to Dermal Inflammation. *Journal of immunology* 189, 337-346.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903-914.
- Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* 202, 919-929.
- Glinka, Y., and Prud'homme, G.J. (2008). Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84, 302-310.
- Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T., and Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *European journal of immunology* 32, 3267-3275.
- Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174, 1783-1786.
- Grawunder, U., West, R.B., and Lieber, M.R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology* 10, 172-180.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589-601.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.

Gu, C., Rodriguez, E.R., Reimert, D.V., Shu, T., Fritzsche, B., Richards, L.J., Kolodkin, A.L., and Ginty, D.D. (2003). Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 5, 45-57.

Gupta, S., Joshi, K., Wig, J.D., and Arora, S.K. (2007). Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol* 46, 792-797.

Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, S., Albert, J., Sparwasser, T., Sakaguchi, S., Westendorf, A.M., *et al.* (2012). Neuropilin-1 deficiency on CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* (accepted).

Hansen, W., Westendorf, A.M., Reinwald, S., Bruder, D., Deppenmeier, S., Groebe, L., Probst-Keppler, M., Gruber, A.D., Geffers, R., and Buer, J. (2007). Chronic antigen stimulation in vivo induces a distinct population of antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 179, 8059-8068.

Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N.H., Carlson, M.R., Li, S.H., Simpson, P.M., Chatila, T.A., and Williams, C.B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *Journal of immunology* 182, 3461-3468.

Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.H., Relland, L.M., *et al.* (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35, 109-122.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 6, 1123-1132.

He, Z., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739-751.

Hengel, R.L., Thaker, V., Pavlick, M.V., Metcalf, J.A., Dennis, G., Jr., Yang, J., Lempicki, R.A., Sereti, I., and Lane, H.C. (2003). Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4⁺ T cells that preferentially respond to recall antigen. *Journal of immunology* 170, 28-32.

Hsieh, S.H., Ying, N.W., Wu, M.H., Chiang, W.F., Hsu, C.L., Wong, T.Y., Jin, Y.T., Hong, T.M., and Chen, Y.L. (2008). Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27, 3746-3753.

Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J.C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G.F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G.K., *et al.* (2004). Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 199, 303-313.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71, 907-920.

- Jacobs, J.F., Nierkens, S., Figdor, C.G., de Vries, I.J., and Adema, G.J. (2012). Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol* 13, e32-42.
- Jaeckel, E., von Boehmer, H., and Manns, M.P. (2005). Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 306-310.
- Jones, E., Dahm-Vicker, M., Simon, A.K., Green, A., Powrie, F., Cerundolo, V., and Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun* 2, 1.
- Jones, E.A., Yuan, L., Breant, C., Watts, R.J., and Eichmann, A. (2008). Separating genetic and hemodynamic defects in neuropilin 1 knockout embryos. *Development* 135, 2479-2488.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews Immunology* 3, 984-993.
- Kawamura, H., Li, X., Goishi, K., van Meeteren, L.A., Jakobsson, L., Cebere-Suarez, S., Shimizu, A., Edholm, D., Ballmer-Hofer, K., Kjellen, L., *et al.* (2008). Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood* 112, 3638-3649.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895-4902.
- Kilshaw, P.J., and Murant, S.J. (1990). A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *European journal of immunology* 20, 2201-2207.
- Kirberg, J., Baron, A., Jakob, S., Rolink, A., Karjalainen, K., and von Boehmer, H. (1994). Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *The Journal of experimental medicine* 180, 25-34.
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995-1005.
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121, 4309-4318.
- Klages, K., Mayer, C.T., Lahl, K., Loddenkemper, C., Teng, M.W., Ngiow, S.F., Smyth, M.J., Hamann, A., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2010). Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Res* 70, 7788-7799.
- Kline, J., Brown, I.E., Zha, Y.Y., Blank, C., Strickler, J., Wouters, H., Zhang, L., and Gajewski, T.F. (2008). Homeostatic proliferation plus regulatory T-cell depletion promotes potent rejection of B16 melanoma. *Clin Cancer Res* 14, 3156-3167.

- Koch, S. (2012). Neuropilin signalling in angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 40, 20-25.
- Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., and Ginty, D.D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.
- Lee, P.P., Fitzpatrick, D.R., Beard, C., Jessup, H.K., Lehar, S., Makar, K.W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M.T., Schlissel, M.S., Nguyen, S., *et al.* (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763-774.
- Lepelletier, Y., Moura, I.C., Hadj-Slimane, R., Renand, A., Fiorentino, S., Baude, C., Shirvan, A., Barzilai, A., and Hermine, O. (2006). Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol* 36, 1782-1793.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *The Journal of experimental medicine* 174, 561-569.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C., and Damle, N.K. (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 176, 1595-1604.
- Liu, F., Lang, R., Zhao, J., Zhang, X., Pringle, G.A., Fan, Y., Yin, D., Gu, F., Yao, Z., and Fu, L. (2011). CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 130, 645-655.
- Liu, V.C., Wong, L.Y., Jang, T., Shah, A.H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B.A., and Lee, C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *Journal of immunology* 178, 2883-2892.
- Lo, D., Freedman, J., Hesse, S., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., and Sherman, L.A. (1992). Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4+ and CD8+ T cells. *European Journal of Immunology* 22, 1013-1022.
- Loser, K., Hansen, W., Apelt, J., Balkow, S., Buer, J., and Beissert, S. (2005). In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity. *Gene Ther* 12, 1294-1304.
- Lyon, M.F., Peters, J., Glenister, P.H., Ball, S., and Wright, E. (1990). The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2433-2437.
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., and Byrne, M.C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews Immunology* 4, 762-774.

- Milpied, P., Renand, A., Bruneau, J., Mendes-da-Cruz, D.A., Jacquelin, S., Asnafi, V., Rubio, M.T., MacIntyre, E., Lepelletier, Y., and Hermine, O. (2009). Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3⁺ Treg. *Eur J Immunol* 39, 1466-1471.
- Miyara, M., and Sakaguchi, S. (2011). Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 89, 346-351.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 136, 2348-2357.
- Mottet, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of immunology* 170, 3939-3943.
- Murphy, K.P., Travers, P., Walport, M. (2011). *Janeway's Immunobiology*, 8th ed. edn (New York, Garland Pub).
- Nasarre, P., Thomas, M., Kruse, K., Helfrich, I., Wolter, V., Deppermann, C., Schadendorf, D., Thurston, G., Fiedler, U., and Augustin, H.G. (2009). Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth. *Cancer research* 69, 1324-1333.
- Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Saito, K., Ikeda, H., Kuribayashi, K., Allen, P.M., Schreiber, R.D., Sakaguchi, S., Old, L.J., *et al.* (2005). Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 681-686.
- Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127, 759-767.
- North, R.J., and Bursucker, I. (1984). Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2⁻ suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2⁺ effector T cells. *The Journal of experimental medicine* 159, 1295-1311.
- Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C.S., Krammer, P.H., and Suri-Payer, E. (2007). Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4⁺CD25⁺ T cells by CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *Journal of immunology* 179, 3578-3587.
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118, 240-249.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research* 59, 3128-3133.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6, 1133-1141.

- Pauza, M.E., Dobbs, C.M., He, J., Patterson, T., Wagner, S., Anobile, B.S., Bradley, B.J., Lo, D., and Haskins, K. (2004). T-cell receptor transgenic response to an endogenous polymorphic autoantigen determines susceptibility to diabetes. *Diabetes* 53, 978-988.
- Piersma, S.J., Jordanova, E.S., van Poelgeest, M.I., Kwappenberg, K.M., van der Hulst, J.M., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Kenter, G.G., Fleuren, G.J., Offringa, R., *et al.* (2007). High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer research* 67, 354-361.
- Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., and Risau, W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359, 845-848.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., and Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother* 60, 1161-1171.
- Probst-Kepper, M., Geffers, R., Kroger, A., Viegas, N., Erck, C., Hecht, H.J., Lunsdorf, H., Roubin, R., Moharregg-Khiabani, D., Wagner, K., *et al.* (2009). GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med* 13, 3343-3357.
- Proescholdt, M.A., Jacobson, S., Tresser, N., Oldfield, E.H., and Merrill, M.J. (2002). Vascular Endothelial Growth Factor is Expressed in Multiple Sclerosis Plaques and Can Induce Inflammatory Lesions in Experimental Allergic Encephalomyelitis Rats. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61, 914-925.
- Roncador, G., Brown, P.J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecuadrada, J.L., Ling, K.L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B.C., Cerundolo, V., *et al.* (2005). Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *European journal of immunology* 35, 1681-1691.
- Roscoe, W.A., Welsh, M.E., Carter, D.E., and Karlik, S.J. (2009). VEGF and angiogenesis in acute and chronic MOG(35–55) peptide induced EAE. *Journal of Neuroimmunology* 209, 6-15.
- Rouse, B.T., Sarangi, P.P., and Suvas, S. (2006). Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* 212, 272-286.
- Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20, 323-370.
- Saban, M.R., Sferra, T.J., Davis, C.A., Simpson, C., Allen, A., Maier, J., Fowler, B., Knowlton, N., Birder, L., Wu, X.R., *et al.* (2010). Neuropilin-VEGF signaling pathway acts as a key modulator of vascular, lymphatic, and inflammatory cell responses of the bladder to intravesical BCG treatment. *American journal of physiology* 299, F1245-1256.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 6, 345-352.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 8-27.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182, 18-32.

Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28, 402-413.

Sarukhan, A., Garcia, C., Lanoue, A., and von Boehmer, H. (1998a). Allelic inclusion of T cell receptor alpha genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospecific receptors. *Immunity* 8, 563-570.

Sarukhan, A., Lanoue, A., Franzke, A., Brousse, N., Buer, J., and von Boehmer, H. (1998b). Changes in function of antigen-specific lymphocytes correlating with progression towards diabetes in a transgenic model. *The EMBO journal* 17, 71-80.

Sawada, S., and Littman, D.R. (1991). Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene. *Mol Cell Biol* 11, 5506-5515.

Schmetterer, K.G., Neunkirchner, A., and Pickl, W.F. (2012). Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *Faseb J*.

Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.

Schwarz, Q., Gu, C., Fujisawa, H., Sabelko, K., Gertsenstein, M., Nagy, A., Taniguchi, M., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., Shima, D.T., *et al.* (2004). Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev* 18, 2822-2834.

Scott, P., and Trinchieri, G. (1995). The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Current opinion in immunology* 7, 34-40.

Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636-645.

Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of immunology* 163, 5211-5218.

- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology* 3, 135-142.
- Siu, G., Wurster, A.L., Duncan, D.D., Soliman, T.M., and Hedrick, S.M. (1994). A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene. *The EMBO journal* 13, 3570-3579.
- Sojka, D.K., Huang, Y.H., and Fowell, D.J. (2008). Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124, 13-22.
- Soker, S., Fidler, H., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1996). Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *The Journal of biological chemistry* 271, 5761-5767.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.
- Solomon, B.D., Mueller, C., Chae, W.J., Alabanza, L.M., and Bynoe, M.S. (2011). Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2040-2045.
- Steitz, J., Bruck, J., Lenz, J., Knop, J., and Tuting, T. (2001). Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer research* 61, 8643-8646.
- Stockmann, C., Doedens, A., Weidemann, A., Zhang, N., Takeda, N., Greenberg, J.I., Cheresch, D.A., and Johnson, R.S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* 456, 814-818.
- Suffia, I., Reckling, S.K., Salay, G., and Belkaid, Y. (2005). A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *Journal of immunology* 174, 5444-5455.
- Sutmoller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R., and Melief, C.J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of experimental medicine* 194, 823-832.
- Takagi, S., Tsuji, T., Amagai, T., Takamatsu, T., and Fujisawa, H. (1987). Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol* 122, 90-100.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 192, 303-310.

Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C.D., Cleary, K.R., and Ellis, L.M. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer research* 55, 3964-3968.

Takamatsu, H., Takegahara, N., Nakagawa, Y., Tomura, M., Taniguchi, M., Friedel, R.H., Rayburn, H., Tessier-Lavigne, M., Yoshida, Y., Okuno, T., *et al.* (2010). Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nature immunology* 11, 594-600.

Tanaka, H., Tanaka, J., Kjaergaard, J., and Shu, S. (2002). Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *Journal of immunotherapy* 25, 207-217.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 199, 1455-1465.

Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* 188, 287-296.

Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *Journal of immunology* 164, 183-190.

Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., and Romeo, P.H. (2002). A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nature immunology* 3, 477-482.

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 199, 971-979.

Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.

von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* 6, 338-344.

Wada, J., Suzuki, H., Fuchino, R., Yamasaki, A., Nagai, S., Yanai, K., Koga, K., Nakamura, M., Tanaka, M., Morisaki, T., *et al.* (2009). The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer Res* 29, 881-888.

Wang, L., Zeng, H., Wang, P., Soker, S., and Mukhopadhyay, D. (2003). Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *The Journal of biological chemistry* 278, 48848-48860.

Wang, X., Fujita, M., Prado, R., Tousson, A., Hsu, H.C., Schottelius, A., Kelly, D.R., Yang, P.A., Wu, Q., Chen, J., *et al.* (2010). Visualizing CD4 T-cell migration into

inflamed skin and its inhibition by CCR4/CCR10 blockades using in vivo imaging model. *Br J Dermatol* 162, 487-496.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275.

Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., and Vignali, D.A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 66, 2603-2622.

Ye, M., and Graf, T. (2007). Early decisions in lymphoid development. *Current opinion in immunology* 19, 123-128.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., Schreiber, H., and Fu, Y.X. (2005). Intratumor depletion of CD4⁺ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *The Journal of experimental medicine* 201, 779-791.

Yuan, X.L., Chen, L., Zhang, T.T., Ma, Y.H., Zhou, Y.L., Zhao, Y., Wang, W.W., Dong, P., Yu, L., Zhang, Y.Y., *et al.* (2011). Gastric cancer cells induce human CD4Foxp3 regulatory T cells through the production of TGF-beta1. *World J Gastroenterol* 17, 2019-2027.

Zarek, P.E., Huang, C.T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G., and Powell, J.D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111, 251-259.

Zhang, S., Zhang, H., and Zhao, J. (2009). The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochemical and biophysical research communications* 384, 405-408.

Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* 8, 967-974.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20, 4-12.

Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 6, 295-307.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	anti-
A2AR	Adenosin-Rezeptor 2A
Abb.	Abbildung
aLN	axillarer Lymphknoten
APC	Allophycocyanin
BFA	Brefeldin-A
BrdU	Bromdesoxyuridin
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
cRNA	engl. <i>copy ribonucleic acid</i> , kopierte Ribonukleinsäure
CT	engl. <i>colonic tumor</i>
CT-Wert	engl. <i>cycle threshold</i> , Fluoreszenzschwellenwert
CTL	engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxische T-Lymphozyte
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Cre	engl. <i>cyclization recombination</i>
Cy3	Cyanin-3
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DEPC	Diethyldicarbonat
dLN	drainierender Lymphknoten
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
et al.	lat. <i>et altera</i> (und andere)

FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FIC	Fox-IHRES-Cre
FITC	Flouresceinisothiocyanat
Foxp3	engl. <i>forkhead box protein P3</i>
FSC	engl. <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
Garp	engl. <i>glycoprotein-A repetitions predominant</i>
GITR	engl. <i>glucocorticoid induced TNFR family related gene</i>
Gzm	Granzym
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff
HER2	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i.v.	intravenös
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iLN	inguinaler Lymphknoten
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IPEX	engl. <i>Immudysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X linked Syndrom</i>
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
IVC	engl. <i>individually ventilated cage</i>
LFA-1	engl. <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LN	engl. <i>lymph node</i> , Lymphknoten
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumdihydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	engl. <i>knock-out</i>

Lag3	engl. <i>lymphocyte-activation gene 3</i>
Lck	engl. <i>lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase</i>
LPA	Lineares Polyacrylamid
MACS	engl. <i>magnetic activated cell sorting</i>
MEF	engl. <i>mouse embryonic fibroblast</i> , embryonale Fibroblasten der Maus
MFI	engl. <i>mean fluorescent intensity</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mLN	mesenteriale Lymphknoten
MT	Metallothionein
MS	Multiple Sklerose
n	Stichprobenumfang
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	nicht signifikant
nTregs	natürliche regulatorische T-Zellen
Nrp1	Neuropilin-1
PB	Pacific Blue TM
PBS	engl. <i>phosphate buffer solution</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	engl. <i>programmed cell-death 1</i>
PE	Phycoerythrin
PMA	engl. <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
Rag2	engl. <i>recombination activating gene 2</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPS9	ribosomales Protein 9
RT	reverse Transkription

ROR	engl. <i>retinoid related orphan receptor</i>
s.c.	lat. <i>subcutan</i>
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sema3A	Semaphorin 3A
SPF	speziell Pathogen-frei
SSc	engl. <i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
T _A	engl. <i>annealing temperature</i>
Tab.	Tabelle
T-bet	engl. <i>T-box transcription factor expressed in T cells</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCR	engl. <i>T cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TE	Tris/EDTA
T _H	Helfer T-Zelle
TG	transgen
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor-β</i>
T _H 1	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle Typ 2
T _H 3	T-Helferzelle Typ 3
T _H 17	T-Helferzelle Typ 17
TNF- α	engl. <i>tumor necrosis factor-α</i> , Tumornekrosefaktor- α
Tnfrsf	engl. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
Tr1	regulatorische T-Zelle Typ 1
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1, S.15: Entstehung von regulatorischen T-Zellen im Thymus und in der Peripherie (modifiziert nach Curotto de Lafaille und Lafaille 2009)
- Abb. 1.2, S.18: Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen (modifiziert nach Workman *et al.* 2009)

- Abb. 1.3, S.21: Struktur von Neuropilin-1 (modifiziert nach Ellis, 2006)
- Abb. 1.4, S.23: Unter nicht-entzündlichen Bedingungen haben Tregs durch die Expression von Nr1 auf der Zelloberfläche gegenüber naiven T-Zellen einen Vorteil bei der Interaktion mit DCs (modifiziert nach Mizui und Kikutani, 2008)
- Abb. 3.1, S.46: CD4E/p-sil Expressionsvektor mit *nr1* cDNA
- Abb. 3.2, S.47: Expressionsanalysen CD4-Nr1 transgener Mäuse im Hinblick auf den Anteil an Nr1-positiven T-Zellen
- Abb. 3.3, S.49: Expressionsanalysen CD4-Nr1 transgener Mäuse im Hinblick auf die Expressionsstärke von Nr1
- Abb. 3.4, S.50: Die Überexpression von Nr1 in CD4-Nr1 transgenen Mäusen hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation
- Abb. 3.5, S.51: Verändertes Genexpressionsprofil von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nr1 Mäusen nach Stimulation *in vitro*
- Abb. 3.6, S.52: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nr1 Mäusen zeigen nach Stimulation *in vitro* eine veränderte Expression von Aktivierungs-abhängigen Molekülen
- Abb. 3.7, S.54: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nr1 Mäusen zeigen *in vitro* reduzierte proliferative Aktivität, besitzen aber keine suppressiven Eigenschaften
- Abb. 3.8, S.56: Die Sekretion pro- und anti-entzündlicher Zytokine nach *in vitro* Stimulation wird durch die Expression von Neuropilin-1 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen beeinflusst
- Abb. 3.9, S.57: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4-Nr1 x TCR-HA Mäusen zeigen verminderte proliferative Aktivität nach Antigen-spezifischer Stimulation *in vitro*
- Abb. 3.10, S.58: Die Expression von Nr1 auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, die den HA-spezifischen T -Zellrezeptor exprimieren, beschleunigt die Entstehung von Diabetes in INS-HA x Rag2KO transgenen Mäusen
- Abb. 3.11, S.61: In CD4cre x Nr1^{flox/flox} Mäusen (Nr1-KO) wird die Expression von Nr1 spezifisch auf CD4⁺ T-Zellen, insbesondere auf CD4⁺CD25⁺ Tregs ausgeschaltet.

- Abb. 3.12, S.63: Die Deletion von Nrp1 auf CD4⁺ T-Zellen hat keinen Einfluss auf ihre Entwicklung oder auf die Verteilung anderer Zellen des Immunsystems
- Abb. 3.13, S.65: Nrp1 defiziente CD4⁺CD25⁺ Tregs zeigen *in vitro* keine Reduktion ihrer suppressiven oder proliferativen Eigenschaften
- Abb. 3.14, S.67: Die spezifische Deletion von Neuropilin-1 in CD4⁺ T-Zellen verlangsamt das Tumorwachstum und führt zu einer verstärkten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen im Tumor (Veröffentlicht in: Hansen *et al.* 2012)
- Abb. 3.15, S.68: Die Infiltration von Foxp3⁺ T-Zellen in den Tumor wird durch die spezifische Deletion von Neuropilin-1 in CD4⁺ T-Zellen gestört (Veröffentlicht in: Hansen *et al.* 2012)
- Abb. 3.16, S.69: Tumorzell-sekretiertes VEGF wird für die Migration von Tregs in den Tumor benötigt (Veröffentlicht in: Hansen *et al.* 2012)
- Abb. 3.17, S.71: Die Treg-spezifische Deletion von Nrp1 in FIC-Nrp1-KO Mäusen führt zu verlangsamtetem Tumorwachstum einhergehend mit der erhöhten Anzahl und Aktivierung von intratumoralen CD8⁺ T – Zellen (Teilweise veröffentlicht in: Hansen *et al.* 2012)
- Abb. 3.18, S.73: Der Transfer von WT Nrp1-positiven CD4⁺CD25⁺ T-Zellen kann den Phänotyp in Tumor-tragenden Nrp1-KO Mäusen aufheben (Veröffentlicht in: Hansen *et al.* 2012)

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.1, S.29: Chemikalien
- Tab. 2.2, S.32: Oligonukleotide
- Tab. 2.3, S.33: Enzyme
- Tab. 2.4, S.33: Antikörper für die Durchflusszytometrie
- Tab. 2.5, S.34: Fluorophore
- Tab. 2.6, S.35: Geräte

Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Funktionelle Charakterisierung von Neuropilin-1 in CD4⁺ T Zellen*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Marina Hutzler befürworte.

Essen, den _____

Wiebke Hansen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Marina Hutzler

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Marina Hutzler